

Evolución de compuestos de interés biológico en moras a lo largo de la maduración del fruto



Carlos Borrego Corchado
Máster en Agroalimentación

Tutores
Estrella Espada Bellido
Gerardo Fernández Barbero

Especialidad: Producción Agroalimentaria
Trabajo Fin de Máster Perfil Investigador

Julio 2018



Facultad de Ciencias

Evolución de compuestos de interés biológico en moras a lo largo de la maduración del fruto

Carlos Borrego Corchado

Máster en Agroalimentación

2017-2018



MEMORIA PRESENTADA POR
CARLOS BORREGO CORCHADO
PARA OPTAR AL MÁSTER EN
AGROALIMENTACIÓN

Fdo.: Carlos Borrego Corchado



Dr. D. Gerardo Fernández Barbero y Dra. Dña. Estrella Espada Bellido, Profesores del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Evolución de compuestos de interés biológico en moras a lo largo de la maduración del fruto”**, ha sido realizado bajo su tutorización por D. Carlos Borrego Corchado para optar al Máster en Agroalimentación por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman el presente documento

En Puerto Real, a 18 de julio de 2018

Fdo.: Dr. D. Gerardo Fernández Barbero

Fdo.: Dra. Dña. Estrella Espada Bellido



*“Mira profundamente en la naturaleza y
entonces comprenderás todo mejor”*

Albert Einstein



Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Aspectos generales.....	4
1.2. Especies de estudio	5
1.2.1. <i>Rubus ulmifolius</i>	5
1.2.2. <i>Morus nigra</i>	5
1.2.3. <i>Morus alba</i>	6
1.3. Compuestos de interés biológico	6
1.3.1. Sustancias antioxidantes	6
1.3.2. Ácidos orgánicos y azúcares.....	8
1.4. Extracción de compuestos de interés biológico	9
1.4.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)	9
1.5. Importancia de la madurez del fruto	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Material biológico empleado	11
2.2. Disolventes y reactivos	11
2.3. Procedimiento de extracción.....	12
2.3.1. Condiciones óptimas de extracción	13
2.4. Análisis de compuestos fenólicos totales.....	14
2.5. Análisis de la capacidad antioxidante	15
2.6. Identificación de antocianinas.....	15
2.7. Análisis y cuantificación de antocianinas	17
2.8. Análisis de azúcares y ácidos orgánicos	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19



3.1. Zarzamora (<i>Rubus ulmifolius</i>)	19
3.1.1. Evolución del contenido de compuestos fenólicos.....	20
3.1.2. Evolución del contenido total de antocianinas	21
3.1.3. Evolución del contenido de azúcares y ácidos orgánicos.....	22
3.1.4. Evolución de la capacidad antioxidante	24
3.2. Mora negra (<i>Morus nigra</i>)	24
3.2.1. Evolución del contenido de compuestos fenólicos.....	25
3.2.2. Evolución del contenido total de antocianinas	26
3.2.3. Evolución del contenido de azúcares y ácidos orgánicos.....	27
3.2.4. Evolución de la capacidad antioxidante	28
3.3. Mora blanca (<i>Morus alba</i>)	29
3.3.1. Evolución del contenido de compuestos fenólicos.....	30
3.3.2. Evolución del contenido total de antocianinas	30
3.3.3. Evolución del contenido de azúcares y ácidos orgánicos.....	30
3.3.4. Evolución de la capacidad antioxidante	32
4. CONCLUSIONES	33
5. PLAN DE DIFUSIÓN	35
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35
7. ANEXOS.....	41



RESUMEN

La maduración de los frutos es un proceso fisiológico complejo y altamente regulado en el que se producen cambios importantes sobre las características fitoquímicas y bioquímicas de los mismos. Afecta al color, al aroma, a la estructura del fruto, así como a su calidad, hasta el completo desarrollo del fruto maduro.

Las frutas del género *Morus* y *Rubus* se consumen comúnmente como frutas frescas, zumos y bebidas alcohólicas en forma de licores. En los últimos años, su demanda e interés ha aumentado enormemente, debido a sus posibles beneficios en la salud humana, tales como la reducción del riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías.

En este trabajo, se ha estudiado la evolución de diferentes compuestos de interés biológico (compuestos fenólicos, antocianinas, azúcares, ácidos orgánicos y capacidad antioxidante) durante el proceso de maduración de diferentes frutos rojos, zarzamora (*Rubus ulmifolius*), mora negra (*Morus nigra*) y mora blanca (*Morus alba*).

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales, se ha empleado el procedimiento de Folin-Ciocalteu mediante espectroscopía UV-Vis. Para la identificación de las antocianinas se ha empleado un equipo de cromatografía de ultra-eficacia acoplado a un espectrómetro de masas (UHPLC-Q-ToF-MS), y para su separación y cuantificación, se ha utilizado un equipo de cromatografía HPLC con detector UV-Vis, midiendo a 520 nm, siendo ésta la longitud de onda del máximo de absorción de las antocianinas. Las antocianinas identificadas han sido cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-xilósido, cianidina-3-*O*-(6"-malonil-glucósido) y cianidina-3-*O*-(6"-dioxalil-glucósido) en zarzamora, y el 3-*O*-glucósido y el 3-*O*-rutinósido tanto de cianidina como de pelargonidina en moras negras. El análisis de azúcares y ácidos orgánicos se ha llevado a cabo mediante un sistema de cromatografía iónica en el que los principales azúcares identificados han sido glucosa y fructosa, mientras que los ácidos orgánicos mayoritarios han sido el ácido cítrico y el ácido málico. La capacidad antioxidante se midió mediante el método ABTS, expresada como mg equivalentes de trolox.

Se ha observado que a medida que los frutos maduran, su composición y propiedades fisicoquímicas cambian drásticamente después de las etapas media a tardía. Los frutos maduros contienen menor cantidad de ácidos orgánicos que en las etapas intermedias, así como una gran cantidad de azúcares, donde predomina especialmente la



glucosa. Por otra parte, las frutas maduras de las moras estudiadas son ricas en antocianinas y compuestos fenólicos, lo que resulta en una mayor actividad antioxidante en comparación con la de las frutas inmaduras. Sin embargo, este comportamiento es contrario al que presentan los frutos maduros de las zarzamoras. Estas y otras diferencias en cuanto a la concentración de compuestos de interés biológico tanto en el grado de madurez como en las diferentes frutas estudiadas, pueden ser debidas a factores tales como la diversidad genética, las situaciones ambientales y el grado de madurez.

ABSTRACT

The maturation of the fruits is a complex and highly regulated physiological process in which important changes occur on the phytochemical and biochemical characteristics of them same. It affects the colour, the aroma, the structure of the fruit, as well as its quality, until the full development of the ripe fruit.

Fruits of the genus *Morus* and *Rubus* are commonly consumed as fresh fruits, juices and alcoholic beverages such as liqueurs. In recent years, their demand and interest has increased enormously, due to their possible benefits in human health, such as the reduction of cancer risk, cardiovascular diseases and other pathologies.

In this work, the evolution of different compounds of biological interest (phenolic compounds, anthocyanins, sugars, organic acids and antioxidant capacity) has been studied during the maturation process of different red fruits, blackberry (*Rubus ulmifolius*), black mulberry (*Morus nigra*) and white mulberry (*Morus alba*).

For the quantification of the total phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu procedure was used by UV-Vis spectroscopy. For the identification of the anthocyanins, an ultra-efficient chromatography equipment coupled to a mass spectrometer (UHPLC-Q-ToF-MS) was used, and for the separation and quantification, an HPLC chromatography equipment with UV-Vis detector was used, measuring at 520 nm, which is the maximum absorption wavelength for anthocyanins. The anthocyanins identified have been cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-xyloside, cyanidin-3-*O*-(6"-mononyl-glucoside) and cyanidin-3-*O*-(6"-dixalyl-glucoside) in blackberry, and 3-*O*-glucoside, 3-*O*-rutinoside of both cyanidin and pelargonidin in black mulberries. The analysis of sugars and organic acids has been carried out by means of an ion chromatography system in which the main sugars identified have been glucose and fructose, while the main



organic acids have been citric acid and malic acid. Antioxidant capacity was measured by the ABTS method, expressed as mg trolox equivalents.

It has been observed that as the fruits ripen, their composition and physicochemical properties drastically change since the middle stages. The ripe fruits contain less amount of organic acids than in the intermediate stages, as well as a large amount of sugars, where glucose predominates. On the other hand, the ripe fruits of the mulberries studied are rich in anthocyanins and phenolic compounds, which results in a greater antioxidant activity compared to the immature fruits. However, this behaviour is contrary to that presented by the ripe fruits of the blackberries. These and other differences related to the concentration of the biological compounds of interest in both the degree of maturity and the different fruits studied can be due to factors such as genetic diversity, environmental situations and the degree of maturity.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales

En los últimos años, la demanda y el interés por las frutas frescas de mora ha aumentado entre los consumidores. La razón puede atribuirse a un mayor grado de conciencia en la práctica de dietas saludables, que asocian el consumo regular de pequeños frutos de bayas con mejores condiciones físicas relacionadas con sus fuertes propiedades antioxidantes.¹ Actualmente se promueve a las moras como una rica fuente de polifenoles, compuestos de interés debido a su actividad antioxidante como secuestradores de radicales libres, y sus posibles roles beneficiosos en la salud humana, tales como la reducción del riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías.²⁻⁵

Las frutas de morera y zarzas se consumen comúnmente como frutas frescas, zumos y bebidas alcohólicas como licores. Además, estas frutas tanto maduras como inmaduras se usan como medicinas tradicionales para tónicos, antidiabéticos e inmunoestimulantes,^{6,7} conociéndose sus cualidades medicinales desde el siglo XVI en Europa, donde ya se usaban para tratar las infecciones de la boca y los ojos.⁸

La zarzamora (Figura 1.a.) pertenece al género *Rubus* de la familia *Rosaceae*. Existen numerosas especies dentro de este género, difíciles de clasificar a lo largo de todo el hemisferio norte. La composición química del género *Rubus* varía en función de la variedad, las condiciones de crecimiento, la etapa de madurez y las condiciones de cosecha y almacenamiento.⁹

Por otra parte, la morera (Figura 1.b.) pertenece al género *Morus* de la familia *Moraceae*. Hay veinticuatro especies de moras y una subespecie, con al menos 100 variedades conocidas. La morera se encuentra ampliamente distribuida pudiendo crecer en una gran variedad de condiciones climáticas, topográficas y de suelo. Hay tres especies principales de morera para la producción de fruta: la negra (*Morus nigra*), la roja (*Morus rubra*) y la blanca (*Morus alba*).¹⁰



a



b

Figura 1. a) Imagen del arbusto de *Rubus ulmifolius*. **b)** Imagen de morera



1.2. Especies de estudio

1.2.1. *Rubus ulmifolius*

La zarzamora (*Rubus ulmifolius*) (Figura 2.a.) es un arbusto con sarmientos de hasta dos o tres metros de altura, que se extiende más a lo ancho que a lo alto, pues cada año produce unos vástagos muy largos con fuertes espinas en forma de gancho que suelen ser arqueadas y enraízan al tomar contacto con el suelo durante el otoño. El fruto es la zarzamora, de color rojo intenso en las primeras etapas de la maduración, hasta alcanzar su característico color negro brillante cuando se encuentra maduro. Está formado por numerosas drupas agrupadas en cabezuelas globosas, siendo su sabor dulzón y muy peculiar.³

Entre las diferentes aplicaciones de la zarzamora se encuentra su uso en cocina, especialmente en pastelerías en la preparación de postres, mermeladas, jaleas y, a veces, vinos y licores. Por otra parte, debido a sus propiedades astringentes, antisépticas, diuréticas, etc. puede ser usada con fines medicinales, como por ejemplo, para prevenir y combatir la anemia gracias a su alto contenido en hierro. Diferentes estudios con zarzamoras han demostrado que el elevado contenido en flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos, así como su elevada capacidad antioxidante, contribuye a prevenir el cáncer y disminuir el colesterol.^{3,5}

1.2.2. *Morus nigra*

Las moras (*Morus nigra*) (Figura 2.b.) conocidas como “mora negra”, son frutos jugosos de 2 o 3 centímetros de largo que poseen un color verde en su estado inmaduro hasta alcanzar su extraordinario color negro púrpura pasando por un color rojo intenso en las etapas intermedias de madurez.¹¹ El fruto suele presentarse en racimos de varias drupas pequeñas que presentan un sabor único y ligeramente ácido, pudiendo ser consumidas en todas sus etapas de maduración, siendo especialmente apreciadas por sus características organolépticas cuando alcanzan su estado óptimo de madurez.

Dentro de sus aplicaciones, además del consumo directo del propio fruto, destacan las confituras, jarabes, mermeladas, licores o bebidas elaboradas a partir de las moras. Sus propiedades astringentes y antidiabéticas, hacen que estos frutos puedan emplearse para el tratamiento de faringitis, estomatitis y en pacientes con problemas de hiperglucemia. Algunos estudios realizados con este fruto destacan su uso en el tratamiento de heridas en la boca, así como alimento de los gusanos de seda.¹¹



Recientemente, las moras negras han ganado una importante posición en la industria alimentaria debido a la presencia de una elevada concentración de compuestos con marcada actividad biológica como son las antocianinas.^{12,13} Son frutos ricos en vitamina C, y destacan especialmente por la alta presencia de compuestos fenólicos, así como por su elevada capacidad antioxidante.¹⁴

1.2.3. *Morus alba*

Las moras blancas (*Morus alba*) (Figura 2.c.) al igual que las moras negras, son frutos jugosos de 2 o 3 centímetros de largo, integrados por numerosos granos de pequeño tamaño (drupas) que forman lo que comúnmente se conoce como mora. Esta variedad de moras pasa de un color verde cuando están inmaduras a un color blanco-rosado en su etapa de madurez. Tienen un sabor dominante dulce aunque generalmente presentan un sabor soso e insignificante.¹⁵

Es de destacar que todas las partes de la morera (*Morus alba*), han sido usadas en la medicina tradicional china durante miles de años,¹⁶ particularmente sus hojas, frutos, ramas y corteza.¹⁷ En concreto el fruto, puede ser utilizado para el síndrome de deficiencia de hígado y riñón.¹⁷ Los principales componentes activos en *Morus alba* incluyen flavonoides, alcaloides, estilbenos, aductos tipo Diels-Alder y polisacáridos.¹⁸ Dichos componentes activos tienen actividades antidiabética, inmunomoduladora, anti-inflamatoria, antioxidante, hepatoprotectora y renoprotectora, así como actividades contra la obesidad, siendo sus propiedades antidiabéticas una de las principales y más estudiadas.¹⁶



Figura 2. a) Zarzamora, b) Mora negra, c) Mora blanca

1.3. Compuestos de interés biológico

1.3.1. Sustancias antioxidantes

En nuestro cuerpo, como consecuencia del metabolismo celular, constantemente se están produciendo procesos de oxidación-reducción, es decir, una especie se oxida con



la correspondiente pérdida de electrones, al mismo tiempo que otra especie se reduce, con la aceptación de electrones. Como consecuencia de este proceso se generan lo que se conoce como radicales libres, especies químicas que se caracterizan por poseer uno o más electrones desapareados, siendo por tanto moléculas muy inestables y con una gran tendencia a reaccionar cediendo dichos electrones. Esto da lugar a reacciones en cadena que pueden desencadenar patologías en la persona que experimenta dicha circunstancia y que pueden acarrear diferentes problemas de salud, tales como Alzheimer o cáncer, entre otros. Para evitar esto, se hace necesaria la intervención de las sustancias antioxidantes, pues son las que permiten la eliminación de esas especies reactivas que inducen a la aparición del estrés oxidativo, las cuales se encuentran presentes en gran cantidad de bayas,¹⁹ como las estudiadas en el presente trabajo, *Rubus ulmifolius*, *Morus nigra* y *Morus alba*.

Por esta razón, en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los antioxidantes, incrementándose su presencia en nuestra dieta diaria, tanto de forma directa como indirecta.

1.3.1.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos que contienen un anillo aromático y al menos un grupo fenol en su estructura molecular. En el caso de poseer más de uno, se conocen como polifenoles. Estos compuestos antioxidantes donan un electrón al radical libre y lo convierten en una molécula inocua, evitando el estrés oxidativo, responsable de enfermedades como el cáncer, la esclerosis múltiple o la enfermedad de Parkinson. Se trata de metabolitos secundarios de las plantas, biosintetizados durante el desarrollo natural de la misma, aunque también pueden ser sintetizados en respuesta a diferentes situaciones como el estrés y la radiación UV, es decir, forman parte de aquellos compuestos sintetizados por las plantas que aunque no están implicados en funciones vitales, sí juegan un papel fundamental en funciones de tipo defensivo y en la interacción entre plantas y entre plantas y animales.^{20,21} La concentración en polifenoles de cualquier alimento es muy variable, ya que depende de muchos factores, tales como la variedad o el grado de maduración del vegetal.²²

Los polifenoles representan una gran familia y se clasifican por sus características estructurales como flavonoides (antocianinas, flavonoides o catequinas, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonoides), ácidos fenólicos, estilbenos, taninos y lignanos.^{23,24}



Los principales compuestos fenólicos encontrados en especies de morera son: ácido *p*-cumárico, ácido clorogénico y ácido *p*-hidroxibenzoico.^{10,14,25,26}

1.3.1.2. Antocianinas

Las antocianinas son el componente más importante de las moras. Son un grupo de compuestos fenólicos naturales responsables del atributo de color y de actividades biológicas tales como antioxidantes, antimicrobianas y propiedades anti-inflamatorias protectoras.²⁷⁻²⁹ Desde el punto de vista químico, están formadas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona de la antocianina, unida a algún azúcar (como puede ser la glucosa, galactosa, etc.) mediante un enlace glucosídico (Figura 3).

El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas, tales como, efectos antitumorales, anti-inflamatorios y antidiabéticos, la inhibición de la oxidación de lipoproteínas o la mejora de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo.³⁰

Las principales antocianinas identificadas en las zarzamoras son cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-xilósido, cianidina-3-*O*-(6"-malonil-glucósido) y cianidina-3-*O*-(6"-dioxalil-glucósido), mientras que en moras son cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-rutinósido, pelargonidina-3-*O*-glucósido y pelargonidina-3-*O*-rutinósido.³¹⁻³³

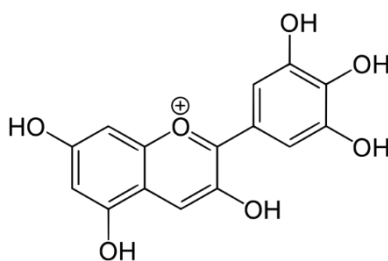


Figura 3. Estructura general de una antocianidina

1.3.2. Ácidos orgánicos y azúcares

Los azúcares libres y los ácidos orgánicos de muchas frutas y verduras son componentes importantes del sabor, que junto con el aroma juegan un papel esencial en la calidad de la fruta y el valor nutritivo,^{31,34} por lo que la naturaleza y la concentración de estos constituyentes en los frutos durante la maduración son de gran interés debido a su importante influencia en las propiedades organolépticas y a su impacto en la calidad del mercado del producto alimenticio,⁹ siendo éstas las razones de su estudio.

Los principales azúcares y ácidos orgánicos identificados en las moras son: glucosa y fructosa, que representan el 75% del total,^{11,35,36} mientras que en el caso de



ácidos orgánicos, el ácido cítrico y el ácido málico son los principales componentes, siendo el ácido cítrico normalmente el mayoritario, presentando desde un 30 a un 90% del total.^{10,36-38} La importancia que presentan estos ácidos a nivel biológico es muy destacada, pues tanto el ácido cítrico como el ácido málico son los acidificantes más empleados en la industria alimentaria y en las bebidas.³⁹

1.4. Extracción de compuestos de interés biológico

La extracción es una técnica que implica el aislamiento del analito que nos interesa, separándolo de la matriz de la muestra, con el uso del correspondiente disolvente, teniendo en cuenta que, inicialmente, la mezcla de estudio puede estar en estado sólido o líquido y que, tras dicha técnica, se llevará a una fase líquida para el posterior proceso analítico,⁴⁰ siendo la extracción sólido-líquido la más empleada para extraer compuestos de interés biológico en la fruta triturada.⁴¹

No obstante, las extracciones de estos compuestos dependen de las condiciones a las que se someta la muestra. Hay muchos factores que influyen sobre dicha extracción como puede ser el método empleado, la temperatura, el disolvente o el pH del medio. Una vez revisada la bibliografía, se observa que los mejores rendimientos se obtienen con mezclas hidroalcohólicas y acidificadas con HCl.^{42,43}

En la bibliografía existe un amplio número de técnicas de extracción como la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción con fluidos presurizados (PLE), la extracción asistida por microondas (MAE) o la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), entre otras, siendo esta última la que se ha empleado en este trabajo.

1.4.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

Los ultrasonidos son ondas de presión de una frecuencia muy elevada (por encima de 20 kHz), por lo que son inaudibles para el oído humano. Se propagan por el medio material con el que se encuentren en contacto provocando el fenómeno de la cavitación, el cual consiste en la formación de cavidades rellenas de vapor en el seno de un líquido. Este hecho es producido debido a los ciclos de expansión y contracción de los ultrasonidos, que rompen las paredes celulares de la matriz vegetal, favoreciendo la penetración del disolvente y la transferencia de masa.⁴⁴ De esta forma, se obtiene un mayor rendimiento en la extracción.⁴⁵

La extracción asistida por ultrasonidos es una técnica que ha sido considerada como “extracción verde”, debido a que se emplea una cantidad pequeña de disolventes, se incrementan los rendimientos y se reduce el tiempo de extracción, lo que provoca una



disminución del consumo de energía y un menor impacto dañino sobre el medio ambiente y los seres humanos.⁴⁶

Por todos estos motivos, la extracción asistida por ultrasonidos es una técnica ampliamente extendida y se ha empleado para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas en numerosos frutos tales como las moras,⁴⁷ las uvas,⁴⁸ las naranjas,⁴⁹ o los arándanos.⁵⁰

1.5. Importancia de la madurez del fruto

Se entiende por maduración al conjunto de procesos de desarrollo y cambios observados en la fruta que provocan una serie de evoluciones en sus características físico-químicas, color, sabor y textura. Así, estos cambios en la composición de la fruta permiten definir distintos estados o etapas de madurez. Las frutas no maduras suelen ser de textura dura y sabor ácido, mientras que después de la maduración, se vuelven blandas, dulces y altamente aromatizadas, por lo que son más aceptables para los consumidores.⁵¹ Las moras inmaduras son de color verde y muy duras, a medida que van madurando adquieren una coloración rojiza en el caso de las zarzamoras y las moras negras, y blanquecina en el caso de las moras blancas, con un ligero olor a madurez en los tres casos. Cuando la fruta alcanza el máximo grado de maduración es de color negro púrpura en la zarzamora y la mora negra, y blanca rosácea en la mora blanca, con un sabor mucho más prominente.

Existen muchos y diferentes estudios dirigidos al conocimiento de la composición de las frutas en su momento de recolección o en su punto óptimo de madurez,⁴⁷⁻⁵⁰ sin embargo, se dispone de poca información acerca de los cambios durante las distintas etapas del desarrollo vegetativo de los frutos y su maduración. Además, en general, la información disponible sobre los cambios durante las etapas de madurez se refieren a azúcares, y ácidos orgánicos, componentes básicos del equilibrio de sabor entre dulce y agrio.^{9,52,53}

En la maduración de los cítricos, el contenido de azúcares aumenta y el de ácidos disminuye, como ocurre en naranjas y pomelos,^{54,55} en los limones en cambio ocurre lo contrario. En la manzana según Ackerman y col.,⁵⁶ la fructosa, sacarosa y glucosa mantienen unos niveles constantes después de la cosecha hasta que se inicia una caída de los mismos.

En el caso concreto de las moras, la calidad nutricional de la fruta durante la maduración se ha convertido en un problema cada vez más importante en los últimos



años, sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han centrado principalmente en las frutas maduras.⁵⁷ Por lo tanto, se hace necesario estudiar el comportamiento de la calidad nutricional desde las primeras etapas de la maduración hasta la recolección de las mismas.⁵⁸ Según Lou y col.,⁵⁸ la evolución de fenoles totales, flavonoides totales, azúcares y actividad antioxidante en frutos de moras tiene efectos importantes sobre sus características fitoquímicas y bioquímicas afectando a la calidad, al valor nutricional, al tiempo de cosecha y la puesta en el mercado de las mismas.

En este trabajo han sido estudiadas tres especies de diferentes frutos rojos: zarzamoras (*Rubus ulmifolius*), moras negras (*Morus nigra*) y moras blancas (*Morus alba*) en 8 estados de madurez con el objetivo de estudiar la evolución de los diferentes compuestos de interés biológico a lo largo de las diferentes etapas de su proceso de maduración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico empleado

Las muestras de zarzamora se recolectaron en el Concejo de Cudillero (Asturias), tomándose de varios arbustos ubicados dentro de la misma zona pero en diferentes etapas de madurez durante el mes de agosto de 2017. Por otro lado, las muestras de moras negras y blancas, se recogieron en una misma zona de la localidad de Puerto Real (Cádiz) en los meses de abril y mayo de 2018, para conseguir así diferentes puntos de madurez.

Los frutos se almacenaron en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de ser liofilizadas en un liofilizador de la marca Telstar Lyoalfa 15 Plus en los laboratorios del Instituto de Investigación de Biomoléculas (INBIO) en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz. La liofilización de la muestra consiste en congelar el fruto a una temperatura baja, seguida de una etapa de alto vacío en la que se elimina el hielo por sublimación. Así, se consigue eliminar toda el agua presente en el fruto para una mejor conservación y extracción. Las muestras una vez liofilizadas se trituraron en un molinillo de café (Mandine, Barcelona, España) hasta que se obtuvo una muestra homogénea para el análisis. Posteriormente, las muestras se almacenaron en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

2.2. Disolventes y reactivos

Para realizar las distintas extracciones se emplearon como disolventes metanol (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) y agua a diferentes valores de pH (3 y



7). Para el ajuste de los valores de pH se emplearon disoluciones de concentración 1 M de ácido clorhídrico (Panreac, Barcelona, España) e hidróxido de sodio (Panreac, Barcelona, España), ambas de grado analítico, y un pH-metro (Crison, GLP 22, Barcelona, España). El agua empleada para dichas extracciones era de calidad Milli-Q, obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore (Bedford, Massachusetts, Estados Unidos).

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales a través del método de Folin-Ciocalteu, se empleó agua Milli-Q, reactivo de Folin-Ciocalteu (una mezcla de fosfomolibdato de sodio y fosfotungstato de sodio) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), carbonato de sodio anhidro (Panreac, Barcelona, España) y como patrón ácido gálico (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

En el caso del análisis de antocianinas, se emplearon para las separaciones cromatográficas dos eluyentes, eluyente A: ácido fórmico al 5% en agua Milli-Q (Scharlau, Barcelona, España), y eluyente B: metanol (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) y como estándar de antocianos se utilizó el cloruro de cianidina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y el cloruro de pelargonidina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Para el análisis de azúcares y ácidos orgánicos, se emplearon como eluyentes: hidróxido de sodio 300 mM/acetato de sodio 1 mM en agua Milli-Q y acetona 12% /ácido sulfúrico 0,4 mM en agua Milli-Q, respectivamente.

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó por el método del secuestro o captación del radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS^{•+}). Para ello se emplearon ABTS (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos), persulfato de potasio (K₂S₂O₈) (Panreac, Barcelona, España) y trolox o ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos) como patrón de referencia.

2.3. Procedimiento de extracción

Para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas totales se pesó aproximadamente 0,5 gramos de muestra (*Rubus ulmifolius*, *Morus nigra*, *Morus alba*) y se añadió el volumen de disolvente necesario para su posterior extracción.²⁶ La extracción de los compuestos de interés biológico se realiza mediante extracción asistida por ultrasonidos, a través de un equipo que consta de una Sonda UP 200 S (Ultraschallprozessor Dr. Hielscher. Gmbh, Berlín, Alemania) a través de la cual se puede



modificar el ciclo y la amplitud (energía suministrada por la sonda). Esta sonda está conectada a un baño termostático en la que se puede regular la temperatura (FRIGITERM-10, J.P. Selecta, S.A., Barcelona, España) mediante un sistema de vasos de doble pared (Figura 4). La muestra se coloca en el interior del vaso de doble pared, que se encuentra a la temperatura necesaria para cada extracción y se introduce la sonda de ultrasonidos. La sonda no debe tocar las paredes ni el fondo del vaso para una adecuada extracción. Cada extracción se lleva a cabo bajo las condiciones óptimas de ciclo, amplitud y temperatura para cada tipo de compuestos.²⁶



Figura 4. *Equipo empleado para la extracción asistida por ultrasonidos*

Una vez finalizado el proceso de extracción, la muestra se trasvasa a dos tubos de centrifuga y se deja que alcance la temperatura ambiente. Una vez atemperada la muestra, éstas se centrifugan en una centrífuga de la marca CENTROFRIGER BL-II (Logroño, La Rioja, España) durante 5 min a 8000 rpm para posteriormente verter el sobrenadante (extracto) en un matraz aforado de 25 mL. A continuación, se adiciona el disolvente correspondiente a los dos tubos de centrífuga y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores. Al finalizar este paso, se vierte el sobrenadante nuevamente en el matraz y se enrasa con el eluyente. Finalizado el proceso de extracción, el extracto de la muestra se trasvasa a un vial de vidrio que se almacena en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

2.3.1. Condiciones óptimas de extracción

En estudios previos realizados en el grupo de investigación²⁶ se determinaron las condiciones óptimas del proceso de extracción tanto para compuestos fenólicos totales como para antocianinas en moras, a través de un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken. En ese estudio se llevó a cabo la optimización de la composición del disolvente (50-100% metanol en agua), temperatura (10-70 $^{\circ}\text{C}$), amplitud del ultrasonido (30-70%), ciclo (0,2-0,7 s), pH del disolvente (3-7) y relación masa de muestra: volumen de



disolvente (10, 15 y 20 mL).²⁶ En este mismo trabajo y bajo las condiciones óptimas de extracción, se pudo comprobar como 10 minutos podía ser considerado un tiempo suficiente para realizar una extracción cuantitativa.

Así, las condiciones óptimas de extracción empleadas para compuestos fenólicos totales y antocianinas son las que aparecen reflejadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones óptimas de extracción para antocianinas y compuestos fenólicos totales ²⁶

	% Metanol	pH	Temperatura de extracción (°C)	Amplitud (%)	Ciclo (s)	Ratio (mL)	Tiempo (min)
Compuestos Fenólicos	61	7	64	70	0,7	14	10
Antocianinas	76	3	48	70	0,7	14	10

2.4. Análisis de compuestos fenólicos totales

Para el análisis de los compuestos fenólicos totales se empleó un espectrofotómetro modelo Carry 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos) (Figura 5), que consta de una fuente de luz halógena de wolframio y deuterio y un fotodetector de doble haz. Presenta un ancho de banda de 2 nm y su rango de longitud de onda va desde 190 a 1100 nm con una velocidad de escaneo de hasta 4000 nm/min.



Figura 5. Espectrofotómetro Carry 60 UV-Vis

La determinación de estos compuestos se llevó a cabo mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu. Este procedimiento tiene su base en la reactividad que presentan los compuestos fenólicos presentes en la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato de sodio y fosfotungstato de sodio),⁵⁹ formando un complejo de color azul (Figura 6), que absorbe a un máximo de longitud de onda de 750 nm. Esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de polifenoles, mediante la ley de Lambert-Beer. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

En un matraz aforado de 25 mL se adicionan 250 μ L de muestra, previamente filtradas con un filtro de jeringa de 0,45 μ m (Nylon Syringe Filter, FILTER-LAB, Barcelona, España), 12,5 mL de agua destilada, 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu



y 5 mL de carbonato de sodio anhidro al 20% previamente preparado. Finalmente, se enrasa con agua Milli-Q y se agita para homogeneizar. Debido a la cinética de la reacción, el tiempo necesario antes de medir en el espectrofotómetro para que los reactivos reaccionen y se forme el complejo, es de 30 minutos.

Como paso previo a la medida de las muestras, es necesario la realización de una recta de calibrado en las mismas condiciones y mediante el mismo procedimiento, utilizando ácido gálico como patrón. Para ello, se prepararon patrones de concentración conocida entre 10 y 2000 ppm y se midieron sus valores de absorbancia (Figura 6). La recta de calibrado obtenida fue: $y = 0,0011x + 0,0218$ con un R^2 de 0,9997.

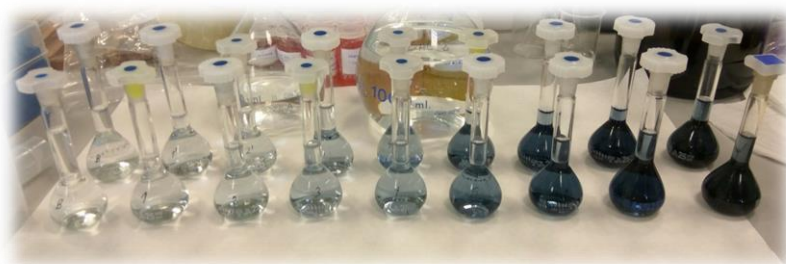


Figura 6. *Patrones de la recta de calibrado*

2.5. Análisis de la capacidad antioxidante

Para el análisis de la capacidad antioxidante se empleó el mismo espectrofotómetro utilizado en el análisis de compuestos fenólicos totales, cuyas características vienen especificadas en el apartado 2.4.

Para su determinación en los tres frutos rojos estudiados se empleó el método ABTS descrito por Re y col.⁶⁰ La disolución de ABTS se preparó mezclando 2,45 mM de persulfato de potasio y 7 mM de ABTS en agua desionizada, manteniéndola durante 12-16 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Antes de su uso, la solución ABTS^{•+} se diluyó con agua desionizada hasta una absorbancia de 0,7171 a 734 nm. Las muestras (50 µL) se dejaron reaccionar con 1 mL de solución ABTS^{•+} durante 10 min. Antes del análisis de las muestras se preparó una recta de calibrado con patrones de trolox desde 0,03125 a 1,7 mM, donde la señal de absorbancia obtenida para el ABTS era restada a la señal de absorbancia obtenida para cada patrón de trolox, obteniendo una recta $y = 0,1056x + 0,0117$ con un R^2 de 0,9977.⁶¹

2.6. Identificación de antocianinas

La identificación de las antocianinas en las muestras se realizó mediante un equipo de cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC) acoplado a un espectrómetro de



masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo, mostrado en la Figura 7 (Xevo G2 QToF, Waters Corp., Milford, Massachusetts, Estados Unidos) el cual contiene un detector PDA, un automuestreador, una columna, así como administradores de disolventes cuaternarios y binarios. La separación cromatográfica se realizó en una columna analítica en fase reversa C18 (Acquity UPLC BEH C18, Waters), con unas dimensiones de $2,1 \times 100$ mm, con un tamaño de partícula de $1,7 \mu\text{m}$.



Figura 7. Equipo UHPLC-Q-ToF-MS

Las antocianinas se identificaron usando dos disolventes, A y B. Como disolvente A se usó agua de calidad Milli-Q acidificada con ácido fórmico al 2%, mientras que como disolvente B se trabajó con metanol puro. La velocidad de flujo fue de $0,4 \text{ mL/min}$. El gradiente utilizado se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Método en gradiente empleado para la identificación de antocianinas

Tiempo (min)	0	3,30	3,86	5,05	5,35	5,64	5,95	7,50
%B	15	20	30	40	55	60	95	95

El tiempo total de ejecución fue de 12 minutos, incluyendo 4 minutos de reequilibrio. Los análisis se llevaron a cabo mediante una fuente de electrospray operando en modo de ionización positiva en las siguientes condiciones: flujo de gas de desolvatación = 700 L/h , temperatura de desolvatación = 500°C , flujo de gas de cono = 10 L/h , temperatura de la fuente = 150°C , voltaje capilar = 700 V , voltaje de cono = 30 V y energía de colisión = 20 eV . Se usó el modo de exploración completa “Full Scan” en el intervalo ($m/z = 100\text{-}1200$).

En el espectro de masas se identificaron las siguientes antocianinas con su relación masa carga (m/z) correspondientes: cianidina-3-*O*-glucósido ($m/z = 449$), cianidina-3-*O*-xilósido ($m/z = 419$), cianidina-3-*O*-(6"-malonil-glucósido) ($m/z = 535$) y cianidina-3-*O*-(6"-dioxalil-glucósido) ($m/z = 593$) en las zarzamoras, y cianidina-3-*O*-glucósido ($m/z = 449$), cianidina-3-*O*-rutinósido ($m/z = 595$), pelargonidina-3-*O*-glucósido ($m/z = 433$) y pelargonidina-3-*O*-rutinósido ($m/z = 579$) en las moras negras (Anexo II).



2.7. Análisis y cuantificación de antocianinas

El análisis de las antocianinas totales una vez identificadas, se realizó siguiendo el procedimiento detallado por Espada-Bellido y col.,²⁶ mediante un equipo UHPLC Elite LaChrom Ultra System (VWR Hitachi, Tokyo, Japón), el cual está compuesto por un automuestreador L-2200U, un horno de columna L-2300 (ajustado a 50 °C de temperatura), dos bombas L-2160U y un detector UV-Vis L-2420U (Figura 8).

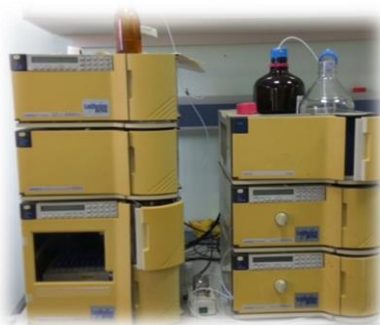


Figura 8. *Equipo de cromatografía HPLC*

Este equipo puede alcanzar hasta 9000 psi de presión. El volumen de inyección empleado fue de 15 μ L. El detector se ajustó a 520 nm, longitud de onda que se corresponde con el máximo de absorción de las antocianinas.

La columna utilizada para este análisis fue una HaloTM C-18, en fase reversa (Phenomenex Kinetex, CoreShell Technology, Estados Unidos), de tipo “Fused-Core”, con unas dimensiones de 100 x 2,1 mm, un tamaño de partículas de 2,6 μ m y un tamaño de poro de 100 Å.

En primer lugar se preparan los dos eluyentes: Eluyente A, agua Milli-Q acidificada al 5% con ácido fórmico, y eluyente B, metanol puro. Ambos eluyentes fueron filtrados con ayuda de un filtro de 0,22 μ m (Nylon Membrane Filter, FILTER-LAB, Barcelona, España) y desgasificados en un baño de ultrasonidos (Elma S300 Elmasonic, Alemania). También se filtraron cada uno de los extractos con un filtro de jeringa de 0,22 μ m (Nylon Syringe Filter, FILTER-LAB, Barcelona, España).

Para la separación de las antocianinas, el método de gradiente seleccionado fue el mismo que aparece establecido por Espada-Bellido y col.,²⁶ que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. *Método en gradiente empleado para la separación cromatográfica de antocianinas*

Tiempo (min)	0	1,5	3,3	4,8	5,5	5,9	6,6	9,3	10
%B	15	20	30	40	55	60	95	95	100



La cuantificación de las antocianinas presentes en las muestras se realizó mediante una recta de calibrado usando como patrón de referencia cloruro de cianidina y el cloruro de pelargonidina, para la cual se prepararon patrones con concentraciones entre 0,1 y 29 ppm. Se elaboró una recta de calibrado para cada una de las siete antocianinas presentes en la zarzamora y la mora negra. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 4, en el que además de la recta de calibrado, se muestra el coeficiente de regresión lineal obtenido (R^2), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).

El límite de detección y cuantificación se calculan de la siguiente manera:

$$\text{LOD} = 3 \cdot S_{\text{blanco}}/m \quad \text{LOQ} = 10 \cdot S_{\text{blanco}}/m$$

m : pendiente de la recta

S : desviación estándar

Tabla 4. Rectas de calibrado, coeficientes de regresión lineal, límites de detección y cuantificación de las antocianinas presentes en la zarzamora y la mora negra

Compuesto	Recta de calibrado	R^2	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Cloruro de cianidina	$y = 262.232x - 2460$	0,9997	0,186	0,620
Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido (C3G)	$y = 188.309x - 2460$	0,9997	0,259	0,863
Cianidina-3- <i>O</i> -rutinósido (C3R)	$y = 142.098x - 2460$	0,9997	0,342	1,143
Cianidina-3- <i>O</i> -xilósido (C3X)	$y = 201.962x - 2460$	0,9997	0,242	0,805
Cianidina-3- <i>O</i> -(6''-malonil-glucósido) (C3MG)	$y = 158.172x - 2460$	0,9997	0,308	1,028
Cianidina-3- <i>O</i> -(6''-dioxalil-glucósido) (C3DG)	$y = 142.702x - 2460$	0,9997	0,342	1,140
Cloruro de pelargonidina	$y = 258.700x - 12807$	0,9994	0,181	0,589
Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucósido (P3G)	$y = 182.966x - 12807$	0,9994	0,256	0,852
Pelargonidina-3- <i>O</i> -rutinósido (P3R)	$y = 136.829x - 12807$	0,9994	0,267	1,138

2.8. Análisis de azúcares y ácidos orgánicos

El análisis de azúcares y ácidos orgánicos se llevó a cabo mediante un sistema de cromatografía iónica (Metrohm, 930 Compact IC Flex, Suiza), equipado con detección amperométrica y con una columna Metrosep Carb 2-150/4.0 en el caso de azúcares (Figura 9.a.), y detección conductimétrica y con una columna Metrosep Organic Acids-columna 250/7.8 en el caso de ácidos orgánicos (Figura 9.b.).



Figura 9. a) Cromatógrafo iónico de azúcares, b) Cromatógrafo iónico de ácidos



Para la separación de los diferentes azúcares se utilizó la siguiente mezcla como eluyente: 300 mM de hidróxido de sodio + 1 mM de acetato de sodio a un flujo isocrático de 0,5 mL/min durante un tiempo de 20 minutos, mientras que la separación de los diferentes ácidos se llevó a cabo usando una mezcla como eluyente: 0,4 mM de ácido sulfúrico + 12% de acetona a un flujo isocrático de 0,4 mL/min durante un tiempo de 25 minutos.

Para este caso específico, se llevaron a cabo 4 estudios univariantes (porcentaje de metanol (0, 25, 50, 80, 100%), temperatura de extracción (10, 20, 40, 50, 55, 60 y 80 °C), valor del pH (3,5 y 7), y tiempo de extracción (3, 6, 9, 10, 12, 15 y 18 min), uno por cada factor a estudiar, manteniendo fijos el ciclo (0,7), la amplitud (70%) y el ratio (14 mL).

De acuerdo a estos resultados (Anexo I), se han establecido como condiciones óptimas de extracción para azúcares totales y ácidos orgánicos totales las que aparecen reflejadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones óptimas de extracción para azúcares y ácidos orgánicos totales

	% Metanol	pH	Temperatura de extracción (°C)	Amplitud (%)	Ciclo (s)	Ratio (mL)	Tiempo (min)
Azúcares	0	7	55	70	0,7	14	6
Ácidos Orgánicos	0	7	55	70	0,7	14	6

Posteriormente a la medida de las muestras de frutos rojos, se preparó un método para azúcares y otro para ácidos orgánicos, con cada una de las rectas de calibrado de los elementos estudiados (Anexo III).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de la evolución de los compuestos de interés biológico, contenido total de compuestos fenólicos, contenido total de antocianinas como suma de antocianinas individuales, azúcares y ácidos orgánicos, así como la capacidad antioxidante, se ha llevado a cabo a lo largo de 8 estados del proceso de maduración del fruto, en las diferentes especies de moras: *Rubus ulmifolius*, *Morus nigra* y *Morus alba*.

A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada una de las especies.

3.1. Zarzamora (*Rubus ulmifolius*)

En el caso de la zarzamora, los 8 estados de madurez del fruto variaron desde un color verde en las primeras etapas de madurez, hasta un color negro intenso en la última etapa de maduración, pasando por etapas intermedias de colores rojizos (Figura 10).



Figura 10. Estados de madurez de la zarzamora (*Rubus ulmifolius*)

3.1.1. Evolución del contenido de compuestos fenólicos

La evolución del contenido de compuestos fenólicos totales a lo largo de los 8 puntos del proceso de maduración se muestra en la Figura 11. Se puede observar como los compuestos fenólicos totales disminuyen de manera considerable desde el estado de madurez 1 (70,63 mg/g) al estado de madurez 8 donde la concentración de compuestos fenólicos es de 25,56 mg/g, siendo estos resultados contrarios a los que inicialmente se podrían esperar ya que por regla general, un estado avanzado de madurez parece estar relacionado con un mayor contenido de compuestos fenólicos. Este hecho puede estar relacionado con la reducción del metabolismo primario en el caso específico de algunas frutas maduras, lo que resulta en una falta de sustratos esenciales para la biosíntesis de compuestos fenólicos.⁵³ Sin embargo, es importante destacar que a pesar de esa disminución a lo largo de la maduración de la fruta, el contenido total de compuestos fenólicos en la fruta madura, puede considerarse dentro del rango aceptado.

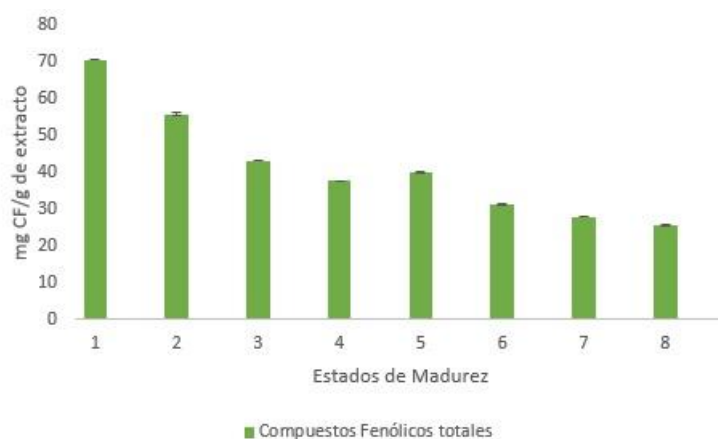


Figura 11. Evolución de los compuestos fenólicos en función del estado de madurez



3.1.2. Evolución del contenido total de antocianinas

En las zarzamoras, las antocianinas presentan un papel importante, responsables del atributo del color y de actividades biológicas tales como antioxidantes, antimicrobianas y propiedades anti-inflamatorias protectoras, por lo que a pesar de que las antocianinas son compuestos fenólicos, debido a su particular importancia merecen ser tratadas por separado. En este trabajo, también se estudió su evolución en los diferentes estados de madurez, observándose en este caso un incremento desde la madurez 1, donde la concentración de antocianinas es de 0,058 mg/g, hasta la madurez 8 cuya concentración es de 8,91 mg/g (Figura 12), siendo estos resultados los esperados y acordes con los de la bibliografía.^{31-33,62}

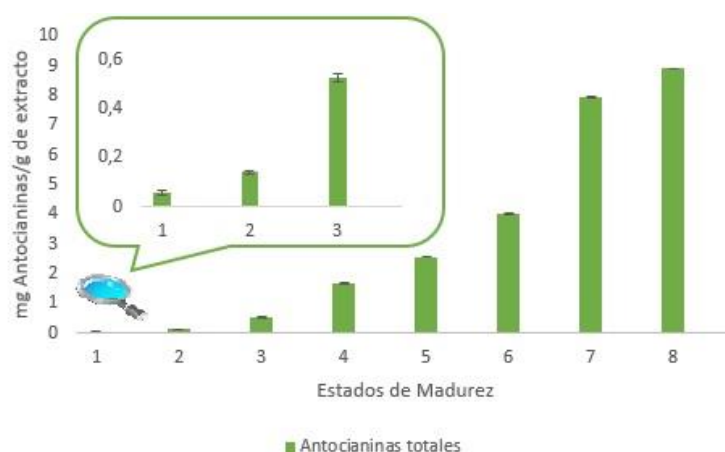


Figura 12. Evolución de las antocianinas totales en función del estado de madurez

El hecho de que los compuestos fenólicos totales disminuyan y el contenido total de antocianinas aumente con el grado de maduración del fruto, resulta inicialmente extraño de acuerdo con la mayoría de trabajos previos encontrados en la bibliografía. Sin embargo, existen varios estudios en diferentes frutas en los que se observa una tendencia similar a la detectada en las zarzamoras, como son la jabuticaba, el guabiju y el jambolan.⁵² Esto puede ser debido a que los compuestos fenólicos están formados por gran cantidad de sustancias antioxidantes (cumarinas, flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, etc.) pudiendo afectar la reducción del metabolismo primario en la zarzamora madura, a la formación en concreto de diferentes compuestos fenólicos individuales y no a la evolución de las antocianinas durante la maduración, como se puede observar con el aumento de coloración del fruto.⁵³ Además, es importante tener en cuenta que la cantidad de compuestos fenólicos totales en las frutas depende del grado de



madurez, de la cosecha, de las diferencias genéticas, de las condiciones ambientales durante el desarrollo y de otros factores.¹⁹

Por otro lado y para completar el estudio, las antocianinas presentes en la zarzamora fueron determinadas de forma individual. En la Tabla 6, se puede observar como las antocianinas mayoritarias son la cianidina-3-*O*-glucósido (C3G) y cianidina-3-*O*-(6''-dioxalil-glucósido) (C3DG) en los primeros estados de madurez, y la C3G y cianidina-3-*O*-xilósido (C3X) en los últimos estados de madurez (7 y 8). En el caso de C3G, se observa un aumento progresivo a medida que el fruto es más maduro, mientras que en el caso de la C3DG aumenta de manera escalonada desde la madurez 1 hasta la madurez 5 para posteriormente disminuir hasta el último estado de madurez. La C3X aumenta de manera suave desde madurez 1 hasta madurez 6, desde donde sufre un aumento del 250% hasta la madurez 8. La cianidina-3-*O*-(6''-malonil-glucósido) (C3MG), es la antocianina minoritaria, la cual sigue una tendencia parecida a la C3DG.

Tabla 6. Evolución individual de las antocianinas con el estado de madurez

Madurez	Antocianinas (mg/g)				
	C3G	C3X	C3MG	C3DG	Total
1	0,039 ± 0,006	0,008 ± 3,31 · 10 ⁻⁴	0,002 ± 3,11 · 10 ⁻⁴	0,010 ± 7,41 · 10 ⁻⁴	0,06 ± 0,007
2	0,080 ± 0,003	0,020 ± 0,001	0,011 ± 3,80 · 10 ⁻⁴	0,031 ± 0,003	0,14 ± 0,007
3	0,188 ± 0,016	0,040 ± 0,004	0,072 ± 1,60 · 10 ⁻⁴	0,230 ± 0,003	0,53 ± 0,015
4	0,620 ± 0,014	0,210 ± 0,004	0,194 ± 0,005	0,671 ± 0,014	1,68 ± 0,037
5	1,120 ± 0,004	0,290 ± 0,008	0,262 ± 0,004	0,912 ± 0,006	2,58 ± 0,021
6	2,320 ± 0,018	0,560 ± 0,006	0,281 ± 0,003	0,861 ± 0,001	4,02 ± 0,026
7	5,650 ± 0,015	1,401 ± 0,005	0,220 ± 0,001	0,683 ± 0,001	7,95 ± 0,020
8	6,470 ± 0,081	1,962 ± 0,072	0,121 ± 0,008	0,360 ± 0,001	8,91 ± 0,001

3.1.3. Evolución del contenido de azúcares y ácidos orgánicos

Además de los compuestos aromáticos, el sabor y el aroma de las frutas se ven significativamente afectados por el contenido de ácidos orgánicos y azúcares (Figura 13). Como puede observarse, el contenido de azúcares disminuye desde la madurez inicial (45,25 mg/g) hasta el punto 3 (37,77 mg/g), para posteriormente aumentar bruscamente hasta el punto final de maduración (448,67 mg/g), sufriendo un aumento del 162% desde la madurez 6 hasta la madurez 8. Estos resultados siguen la tendencia general encontrada en la bibliografía, para manzana,^{56,63} níspero,⁶⁴ fresa,³⁶ y uva⁶⁵ donde los niveles de fructosa y glucosa aumentan en las etapas avanzadas de la madurez del fruto.

Por otro lado, se puede comprobar que el contenido de ácidos orgánicos sigue una tendencia particular, aumentando desde el punto inicial (6,42 mg/g) hasta un máximo en



la madurez 5, donde alcanza los 25,1 mg/g, para posteriormente disminuir hasta la etapa final de maduración (0,58 mg/g). Esta tendencia coincide con la mostrada por Sweetman y col.,⁶⁶ donde el contenido de ácidos orgánicos totales disminuye en el siguiente orden: moras maduras óptimamente > inmaduras > maduras en exceso.

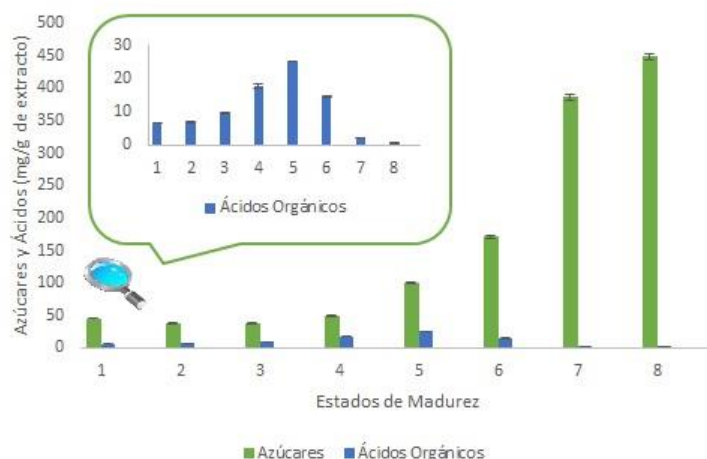


Figura 13. Evolución de los azúcares y ácidos orgánicos totales en función del estado de madurez

Para el caso de azúcares y ácidos orgánicos, también se estudió la composición en la zarzamora de forma individual. Esa fruta contiene abundantes azúcares individuales, de los que se detectaron 10 tipos de polialcoholes, monosacáridos y disacáridos. En la Tabla AIV.1 del Anexo IV, se puede observar como en los primeros estados de madurez del fruto, los polialcoholes (inositol, glicerol, manitol y sorbitol) presentan una mayor concentración a medida que avanza la maduración, mientras que en el caso de los monosacáridos (glucosa, galactosa, fructosa y ribosa), especialmente glucosa y fructosa, aumentan de manera suave hasta el punto 5 para posteriormente incrementar un 356% y un 360%, respectivamente, hasta la madurez 8. La concentración de los disacáridos detectados es bastante pequeña y mantiene una tendencia decreciente.

En cuanto a los ácidos orgánicos, se detectaron dos mayoritariamente, cítrico y málico, presentando resultados semejantes a los que aparecen recogidos en la bibliografía.^{9,67} La concentración tanto de ácido cítrico y ácido málico es mayor en las etapas intermedias de maduración (Tabla AIV.2 del Anexo IV).



3.1.4. Evolución de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de los frutos de zarzamora fue determinada por el método del ABTS expresadas como mg equivalentes de trolox. Se pudo observar como la capacidad de eliminación del ABTS en las frutas de zarzamoras disminuye durante la maduración de 214,67 a 86,70 mg/g (Figura 14). Estos resultados demuestran que la capacidad de eliminación del ABTS se correlaciona directamente con los compuestos fenólicos totales siendo similares a los obtenidos previamente por otros autores en cuatro tipo de bayas distintas donde los compuestos fenólicos totales se correlacionan (coeficiente de correlación $> 0,85$; $p < 0,01$) con la actividad antioxidante mediante dos métodos diferentes (DPPH y ABTS).⁶⁸ Este hecho confirma los resultados iniciales obtenidos para la evolución de los compuestos fenólicos durante las etapas de maduración en este fruto, siendo esta correlación un indicativo de que los compuestos fenólicos totales pueden ser el principal contribuyente de la actividad antioxidante.⁵⁸

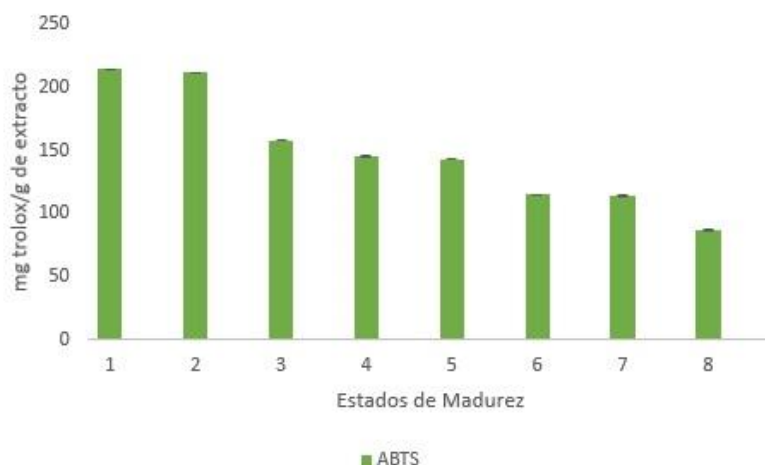


Figura 14. Evolución de la capacidad antioxidante (ABTS) en zarzamora

3.2. Mora negra (*Morus nigra*)

En el caso de las moras negras, los 8 estados de madurez del fruto variaron de un color verde en las primeras etapas de madurez, hasta un color negro púrpura en la última etapa de maduración, pasando por etapas intermedias de color rojizo-verdoso (Figura 15).

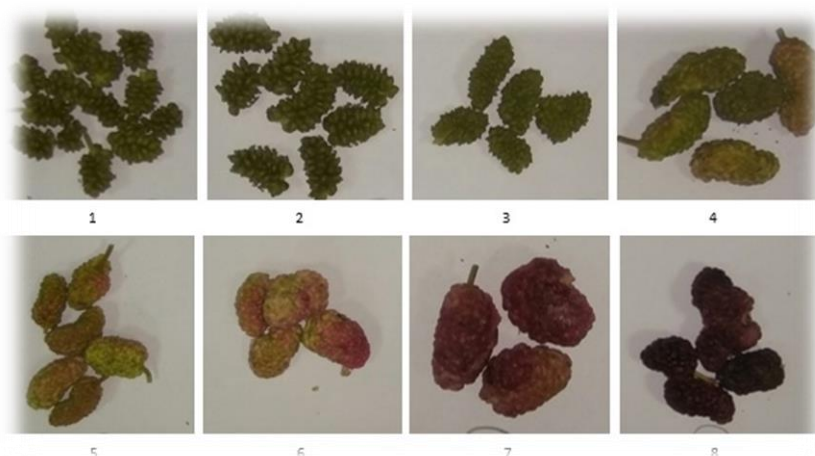


Figura 15. Estados de madurez de la mora negra (*Morus nigra*)

3.2.1. Evolución del contenido de compuestos fenólicos

La evolución del contenido de compuestos fenólicos totales a lo largo de los 8 puntos del proceso de maduración se muestra en la Figura 16. Se puede observar como los compuestos fenólicos aumentan de manera suave desde el estado de madurez 1 (5,23 mg/g) al estado de madurez 8 donde la concentración de compuestos fenólicos es de 9,52 mg/g, siendo en este caso unos resultados más esperados y comparables al de otros trabajos que se encuentran en la bibliografía, donde muestran que el aumento de compuestos fenólicos totales durante la maduración puede ser debido a que en las frutas de color rojo existe una acumulación máxima de antocianinas y flavonoles cuando el fruto está maduro.^{13,57,58,67}

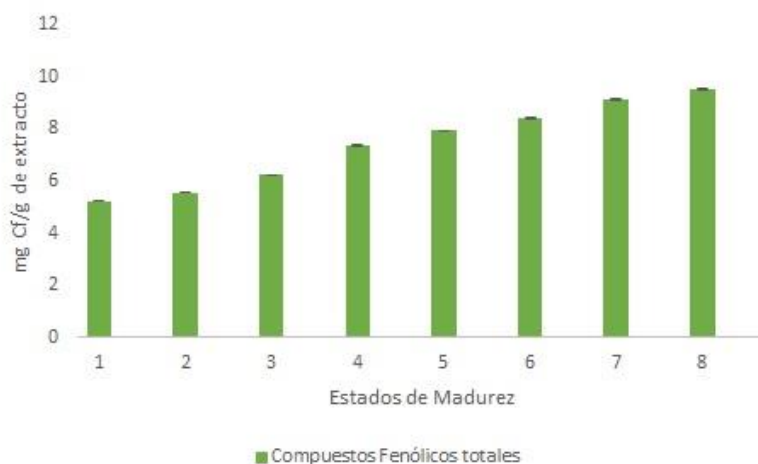


Figura 16. Evolución de los compuestos fenólicos en función del estado de madurez



3.2.2. Evolución del contenido total de antocianinas

Al igual que en las zarzamoras, en las moras negras, las antocianinas presentan un papel importante responsables del atributo de color y de actividades biológicas tales como antioxidantes, antimicrobianas y propiedades anti-inflamatorias protectoras. En este caso, a diferencia de lo ocurrido en el estudio de la zarzamora, la evolución de los compuestos fenólicos y las antocianinas tienen una relación directa, observándose un incremento de éstas desde la madurez 1 donde la concentración de antocianinas es de 0,005 mg/g hasta la madurez 8 cuya concentración es de 2,74 mg/g como se puede observar en la Figura 17. El incremento se acentúa desde el punto 6 al 8 de la maduración donde se produce un aumento en el contenido total de antocianinas del 746%.

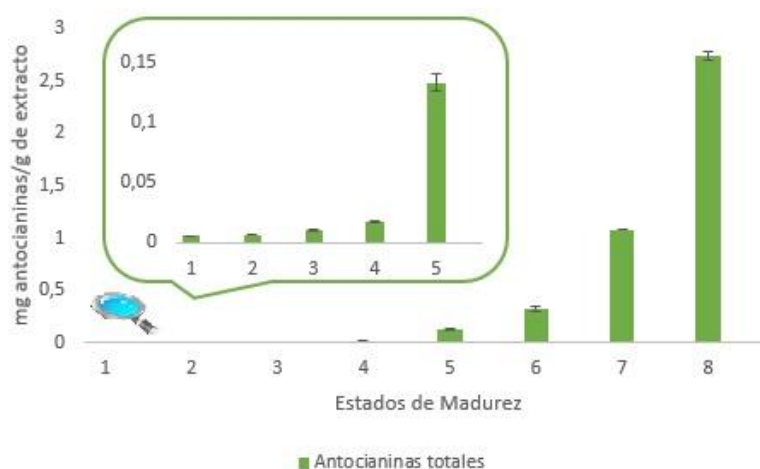


Figura 17. Evolución de las antocianinas totales en función del estado de madurez

Las antocianinas individuales presentes en la mora negra son las que anteriormente se especificaron en el apartado 2.6. Éstas se encuentran en una concentración bastante inferior con respecto a las zarzamoras, donde compuestos fenólicos totales y antocianinas totales aparecen en mayor concentración. En la Tabla 7 se puede observar como las antocianinas mayoritarias son la C3G y C3R, mientras que la pelargonidina-3-*O*-glucósido (P3G) y la pelargonidina-3-*O*-rutinósido (P3R) aparecen en muy baja concentración. Las 4 antocianinas aumentan progresivamente desde el primer estado de madurez hasta el último, siendo el aumento más considerable del punto 7 al 8 donde el incremento es del 105,3%, 178,9%, 400% y 380%, respectivamente. Estos resultados muestran que las antocianinas mayoritarias en moras negras son cianidina-3-*O*-glucósido (C3G) y cianidina-3-*O*-rutinósido (C3R) como aparece en la bibliografía.^{31-33,62}

**Tabla 7.** Evolución individual de las antocianinas con el estado de madurez

Madurez	Antocianinas (mg/g)				
	C3G	C3R	P3G	P3R	Total
1	$0,002 \pm 1,101^{-5}$	$0,001 \pm 7,840^{-5}$	$0,001 \pm 5,321^{-6}$	$0,001 \pm 5,901^{-6}$	$0,005 \pm 7,831^{-5}$
2	$0,003 \pm 1,990^{-5}$	$0,002 \pm 1,331^{-5}$	$0,001 \pm 6,133^{-6}$	$0,001 \pm 6,792^{-6}$	$0,007 \pm 1,951^{-5}$
3	$0,007 \pm 1,811^{-5}$	$0,002 \pm 6,941^{-5}$	$0,001 \pm 1,392^{-6}$	$0,001 \pm 1,553^{-5}$	$0,011 \pm 8,081^{-5}$
4	$0,012 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,001$	$0,001 \pm 7,65^{-7}$	$0,001 \pm 8,48^{-7}$	$0,017 \pm 0,001$
5	$0,063 \pm 0,007$	$0,068 \pm 0,007$	$0,001 \pm 3,73^{-6}$	$0,001 \pm 4,14^{-6}$	$0,133 \pm 0,007$
6	$0,145 \pm 0,007$	$0,161 \pm 0,009$	$0,010 \pm 0,001$	$0,007 \pm 2,26^{-4}$	$0,323 \pm 0,018$
7	$0,508 \pm 0,002$	$0,522 \pm 0,001$	$0,028 \pm 0,003$	$0,020 \pm 1,50^{-4}$	$1,078 \pm 0,001$
8	$1,043 \pm 0,009$	$1,456 \pm 0,022$	$0,140 \pm 0,003$	$0,096 \pm 0,002$	$2,735 \pm 0,038$

3.2.3. Evolución del contenido de azúcares y ácidos orgánicos

Al igual que en las zarzamoras, además de los compuestos aromáticos, el sabor y el aroma de las frutas se ven significativamente afectados por el contenido de ácidos orgánicos y azúcares (Figura 18). Como se muestra, el contenido de azúcares aumenta progresivamente desde la madurez inicial (31,88 mg/g) hasta el punto 6 (129,16 mg/g), para posteriormente aumentar exponencialmente hasta el punto final de maduración (460,53 mg/g), sufriendo un aumento del 257% desde la madurez 6 hasta punto 8 de maduración. Estos resultados al igual que en las zarzamoras siguen la tendencia general encontrada en la bibliografía, para manzana,^{56,63} níspero,⁶⁴ fresa,³⁶ y uva,⁶⁵ donde los niveles de fructosa y glucosa aumentan en las etapas avanzadas de la madurez del fruto.

En cuanto al contenido de ácidos orgánicos, sigue una tendencia similar al caso de las zarzamoras, aumentando desde el punto inicial (8,00 mg/g) hasta un máximo en la madurez 6, donde alcanza los 198,54 mg/g, para posteriormente disminuir hasta la etapa final de maduración (76,81 mg/g). Esta tendencia coincide con la mostrada por Sweetman y col.,⁶⁶ como anteriormente se comentó, donde el contenido de ácidos orgánicos totales disminuye en el siguiente orden: moras maduras óptimamente > inmaduras > maduras en exceso.

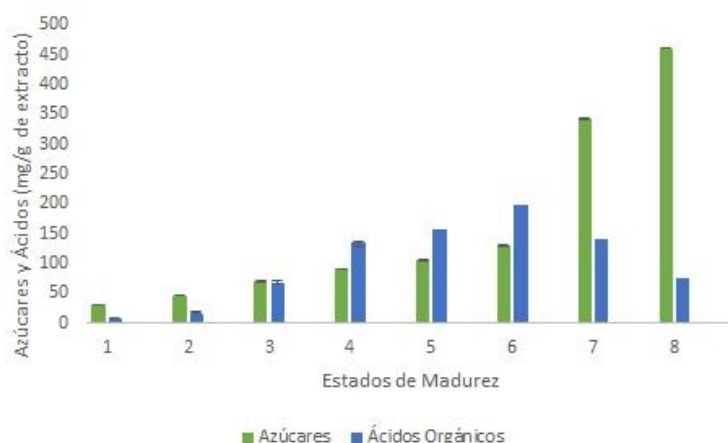


Figura 18. Evolución de los azúcares y ácidos orgánicos totales en función del estado de madurez

La mora al igual que la zarzamora, contiene abundantes azúcares individuales, de los que se detectaron 10 tipos de polialcoholes, monosacáridos y disacáridos, diferenciándose exclusivamente de ésta en que la sacarosa no fue identificada y sí, la maltosa. En la Tabla AVI.1 del Anexo VI, se puede observar como los polialcoholes no presentan una tendencia tan clara, en su mayoría aumentan hasta los estados intermedios de madurez para posteriormente disminuir por regla general. En el caso de los monosacáridos glucosa y fructosa (azúcares mayoritarios) aumentan de manera progresiva hasta el punto 5 para posteriormente aumentar un 441% y un 332%, respectivamente, hasta la etapa final de maduración. La concentración de los disacáridos detectados se mantiene constante en todos los estados de madurez, a excepción de la maltosa que solo aparece en los puntos 5 y 6.

Respecto a los ácidos orgánicos, el cítrico fue el principal ácido orgánico en las moras (Tabla AVI.2, Anexo VI) y representó aproximadamente el 90-95% de ácidos orgánicos totales analizados (ATA). El ácido málico fue el segundo ácido orgánico prevalente en la fruta de mora (5% ATA), siendo estos resultados razonables con respecto a estudios previos en zarzamoras.⁶⁹ La concentración de ácido cítrico es mayor en las etapas intermedias de maduración como ocurre también en el caso del ácido málico (Tabla AVI.2 Anexo VI).

3.2.4. Evolución de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de los frutos de mora fue determinada del mismo modo que en las zarzamoras. La capacidad de eliminación del ABTS en las frutas de moras aumenta durante la maduración de 7,60 a 28,68 mg/g (Figura 19). Estos resultados demuestran que la capacidad de eliminación del ABTS se correlaciona positivamente con



los compuestos fenólicos totales siendo similares a los obtenidos previamente por otros autores en cuatro tipo de bayas distintas donde los compuestos fenólicos totales se correlacionaron positivamente (coeficiente de correlación $> 0,85$; $p < 0,01$) con la actividad antioxidante (DPPH y ABTS).⁶⁸ Este hecho confirma los resultados iniciales obtenidos con los compuestos fenólicos, siendo esta correlación un indicativo de que los compuestos fenólicos totales pueden ser el principal contribuyente de la actividad antioxidante como ya se mencionó con anterioridad.⁵⁸

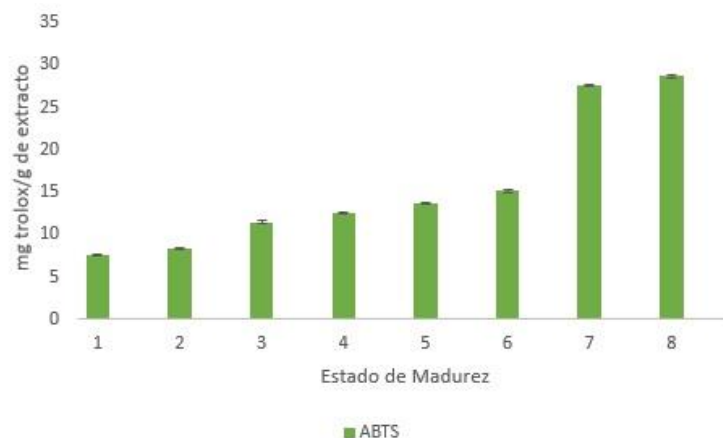


Figura 19. Evolución de la capacidad antioxidante (ABTS) en moras negras

3.3. Mora blanca (*Morus alba*)

En el caso de las moras blancas, las primeras etapas de madurez presentan un color verde hasta la última etapa de maduración donde el fruto presenta un color blanquecino, pasando por etapas intermedias de color blanco-verdoso (Figura 20).

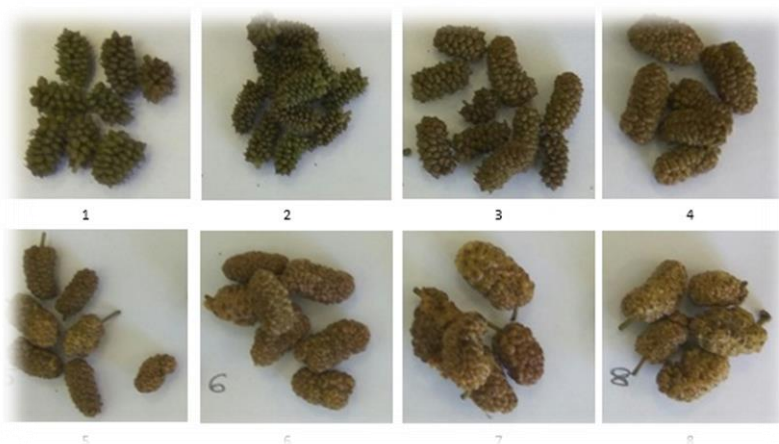


Figura 20. Estados de madurez de la mora blanca (*Morus alba*)



3.3.1. Evolución del contenido de compuestos fenólicos

La evolución del contenido de compuestos fenólicos totales a lo largo de los 8 puntos del proceso de maduración se muestra en la Figura 21. Se puede observar como los compuestos fenólicos totales incrementan su concentración siguiendo una tendencia lineal desde el estado de madurez 1 (4,95 mg/g) al estado de madurez 8 donde la concentración de compuestos fenólicos es de 9,99 mg/g, siendo estos resultados similares aunque un poco inferiores a lo indicado por Lee y col., en su estudio de los cambios en las propiedades fisicoquímicas en moras blancas durante el proceso de maduración.⁵⁷ Otros autores como Siriwoharn y col., también muestran una variación similar a la de nuestro trabajo donde la cantidad de compuestos fenólicos totales en las dos especies *Rubus* estudiadas presentan un aumento pero con cambios poco pronunciados durante la maduración.⁵

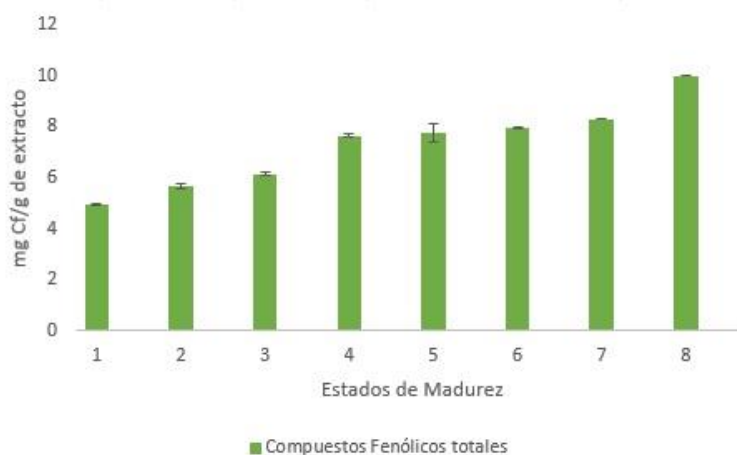


Figura 21. Evolución de los compuestos fenólicos en función del estado de madurez

3.3.2. Evolución del contenido total de antocianinas

En el caso concreto de las moras blancas no se realizó el análisis de la evolución de las antocianinas totales, ya que éstas son pigmentos de color magenta, púrpura o azul, solubles en agua, que colorean las flores, hojas o frutas de muchas plantas, siendo las responsables del atributo del color.⁷⁰ Al presentar éstas un color verdoso-blanquecino durante prácticamente todas las etapas de maduración del fruto, no fue necesario su análisis.

3.3.3. Evolución del contenido de azúcares y ácidos orgánicos

Al igual que en los dos estudios anteriores, además de los compuestos aromáticos, el sabor y el aroma de las frutas se ven significativamente afectados por el contenido de ácidos orgánicos y azúcares (Figura 22). En el caso de las moras blancas al igual que las



moras negras, el contenido de azúcares totales aumenta progresivamente desde la madurez inicial (89,51 mg/g) hasta el punto 5 (284,30 mg/g), para posteriormente aumentar exponencialmente hasta el punto final de maduración (649,45 mg/g), sufriendo un aumento del 128% desde la madurez 5 hasta la maduración final del fruto. Estos resultados al igual que en las zarzamoras y las moras negras siguen la tendencia general encontrada en la bibliografía, para manzana,^{56,63} níspero,⁶⁴ fresa,³⁶ y uva⁶⁵ donde los niveles de fructosa y glucosa aumentan en las etapas avanzadas de la madurez del fruto.

Con respecto al contenido de ácidos orgánicos totales, éstos siguen una tendencia similar a la de los frutos anteriores, pero en este caso la concentración es mucho más constante desde el punto inicial hasta el final del proceso de maduración, siendo la concentración en madurez 1 (4,53 mg/g) hasta un máximo en la madurez 6, donde alcanza los 14,85 mg/g, para posteriormente disminuir hasta el punto final (12,76 mg/g) (Figura 22). Esta tendencia coincide con la mostrada por Sweetman y col.,⁶⁶ como anteriormente se comentó, donde el contenido de ácidos orgánicos totales disminuye en el siguiente orden: moras maduras óptimamente > inmaduras > maduras en exceso.



Figura 22. Evolución de los azúcares y ácidos orgánicos totales en función del estado de madurez.

La mora blanca, contiene un gran número de azúcares individuales y al igual que en los casos anteriores, se detectaron 10 tipos de polialcoholes, monosacáridos y disacáridos. En la Tabla AVIII.1 del Anexo VIII, se puede apreciar como los polialcoholes no presentan una tendencia conjunta; el inositol aumenta hasta el punto 4 para después disminuir, el glicerol aumenta progresivamente con la madurez, mientras que el sorbitol presenta una mayor concentración en las primeras etapas de madurez para después decrecer. Por otra parte la presencia de manitol puede considerarse circunstancial. Los monosacáridos en cambio, todos aumentan de manera progresiva



desde el inicio al final de la maduración, siendo la glucosa y la fructosa los azúcares mayoritarios.

Respecto a los ácidos orgánicos individuales, el ácido principal encontrado es el ácido málico, el cual representó aproximadamente el 85-90% de ácidos orgánicos totales analizados (ATA). En este caso, el segundo ácido analizado es el ácido cítrico que representa en torno al 10-15% del total de ácidos orgánicos analizados. Estos resultados son contrarios a los de las moras negras pero guardan relación con otros estudios como el de las zarzamoras en Turquía de Kafkas y col., donde el ácido cítrico no es detectado en algunos estados de madurez.⁷¹ La concentración de ácido málico es mayor en las etapas intermedias de maduración mientras que en el caso del cítrico la concentración es mayor al final de la madurez, no estando presente en las etapas iniciales (Tabla AVIII.2 del Anexo VIII).

3.3.4. Evolución de la capacidad antioxidante

La capacidad de eliminación del ABTS en las frutas de mora blanca aumentó durante la maduración de 16,67 a 32,64 mg/g (Figura 23). Estos resultados demuestran que la capacidad de eliminación del ABTS se correlaciona positivamente con los compuestos fenólicos totales siendo similares a los obtenidos previamente por otros autores en cuatro tipo de bayas distintas donde los compuestos fenólicos totales se correlacionaron positivamente (coeficiente de correlación $> 0,85$; $p < 0,01$) con la actividad antioxidante (DPPH y ABTS).⁶⁸ Este hecho confirma los resultados iniciales obtenidos con los compuestos fenólicos, siendo esta correlación un indicativo de que los compuestos fenólicos totales pueden ser el principal contribuyente de la actividad antioxidante como ya se mencionó con anterioridad.⁵⁸

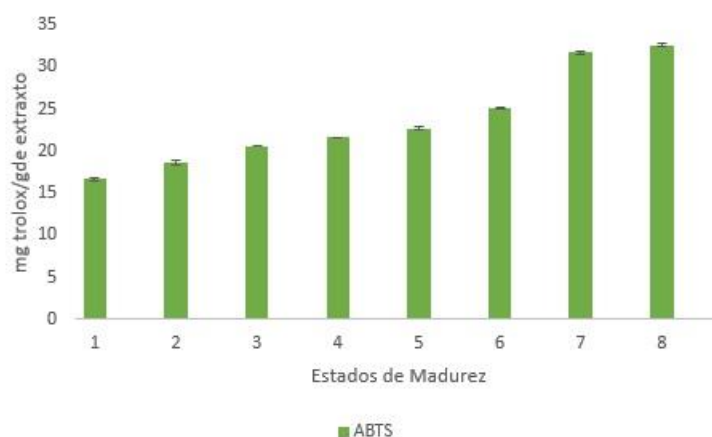


Figura 23. Evolución de la capacidad antioxidante (ABTS) en moras blancas



4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos tras la realización de los distintos estudios de la evolución de los compuestos biológicos de interés a lo largo de las diferentes etapas de la maduración, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los compuestos fenólicos totales evolucionan de manera diferente en las zarzamoras con respecto a las dos especies de moras estudiadas, moras negras y moras blancas. En las zarzamoras, los compuestos fenólicos disminuyen de forma progresiva y continua a lo largo de la maduración, pasando de 70,63 a 25,56 mg/g, mientras que en las moras negras y moras blancas aumentan con el estado de madurez, pasando de 5,23 a 9,52 mg/g y de 4,95 a 9,99 mg/g, respectivamente. Sin embargo, a pesar de las diferentes tendencias, se puede comprobar como el contenido de compuestos fenólicos totales en el estado maduro es mucho mayor en las zarzamoras que en las especies de moras, siendo en moras negras y blancas muy similar.

Estos resultados tan dispares con respecto a la concentración de compuestos fenólicos totales en frutos con características similares como pueden ser (zarzamoras y moras), indican que el contenido de compuestos fenólicos totales en las frutas depende del grado de madurez, de la cosecha, de las diferencias genéticas, de las condiciones ambientales durante el desarrollo del fruto y otros factores.¹⁷ La posible explicación a la disminución de los compuestos fenólicos a lo largo de la maduración de la zarzamora puede estar relacionada con la reducción del metabolismo primario en la fruta madura, lo que resulta en una falta de los sustratos esenciales para la biosíntesis de compuestos fenólicos.⁵³

- Las antocianinas sólo fueron identificadas en las zarzamoras y las moras negras, debido a que las moras blancas no presentan la coloración característica de estos pigmentos. En los casos estudiados, las antocianinas presentan un aumento de la concentración con la madurez, pasando de 0,058 a 8,91 mg/g, en las zarzamoras, y de 0,005 a 2,74 mg/g, en las moras negras. Al igual que en el caso de los compuestos fenólicos totales y como era de esperar, la concentración de antocianinas totales es bastante mayor en las zarzamoras que en las moras negras, siendo un 225% mayor.

- Los resultados de azúcares y ácidos orgánicos en las tres especies estudiadas presentan una tendencia similar. En el caso de azúcares aumentan progresivamente con la madurez, siendo glucosa y fructosa los mayoritarios, mientras que en el caso de los



ácidos orgánicos, los mayoritarios son cítrico y málico, alcanzándose un máximo en las etapas 5-6 con una disminución posterior.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir que la concentración de azúcares en orden decreciente es, moras blancas > moras negras > zarzamoras, siendo las moras blancas las que presentan mayor cantidad de azúcares, mientras que en el caso de ácidos orgánicos es, moras negras > zarzamoras > moras blancas, siendo las moras negras las que presentan un mayor contenido en ácidos. El estado de madurez más adecuado para su consumo y recolección será aquel en el que la concentración de azúcares ya sea importante y a su vez comience a disminuir la concentración de ácidos orgánicos totales.

- Por su parte, la capacidad antioxidante debido a que tiene una relación directa con la concentración de compuestos fenólicos totales, de nuevo evoluciona de manera diferente en las zarzamoras y en las dos especies de moras estudiadas. En las zarzamoras disminuye, mientras que en las dos especies de moras, aumenta con el estado de madurez.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la capacidad antioxidante es mayor en las zarzamoras que en ambas especies de moras, siendo en las moras blancas un poco mayor a las moras negras, aunque con valores muy similares.

- En relación a su potencial uso como fuentes de alimentos, se puede concluir de los estudios realizados que a medida que los frutos maduran, las propiedades fisicoquímicas estudiadas cambian drásticamente. Los frutos maduros contienen menor cantidad de ácidos orgánicos que en las etapas intermedias, así como una gran cantidad de azúcares, donde predomina especialmente la glucosa. Por otra parte, las frutas maduras de ambas especies de moras son ricas en antocianinas y compuestos fenólicos, lo que resulta en una mayor actividad antioxidante en comparación con la de las frutas inmaduras. Sin embargo, este comportamiento es contrario al que presentan los frutos maduros de las zarzamoras. Este estudio da información de la evolución de compuestos de interés biológico que determina de una forma química el momento óptimo de recolección del fruto, siendo este según los resultados obtenidos los puntos 7-8 donde la concentración de compuestos fenólicos, antocianinas y azúcares es alta, mientras que la concentración de ácidos orgánicos comienzan a disminuir.



5. PLAN DE DIFUSIÓN

Como plan para la difusión de este trabajo, una primera vía va a ser la presentación de dos comunicaciones en formato póster: “*Evolución de compuestos de interés biológico en zarzamoras a lo largo de la maduración del fruto*” y “*Evolución durante la maduración de diferentes compuestos de interés biológico en Morus nigra y Morus alba*”, en la XVI REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA, que se celebrará el próximo mes de octubre en Granada. Además, los resultados de este trabajo se encuentran en fase de redacción para su publicación en revistas internacionales de alto índice de impacto.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Oszmiański J, Nowicka P, Teleszko M, Wojdyło A, Cebulak T, Oklejewicz K. Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity in wild blackberry fruits. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):14540-14553.
2. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev*. 2009;56(11):317-333.
3. Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem*. 2002;50(8):2432-2438.
4. Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberrries. *J Agric Food Chem*. 2002;50(12):3495-3500.
5. Siriwoharn T, Wrolstad RE, Finn CE, Pereira CB. Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus L. Hybrids*) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *J Agric Food Chem*. 2004;52(26):8021-8030.
6. Kim SB, Chang BY, Jo YH, et al. Macrophage activating activity of pyrrole alkaloids from *Morus alba* fruits. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(1):393-396.
7. W. Tang, G. Eisenbrand. Handbook of Chinese Medicinal Plants: Chemistry, Pharmacology, Toxicology. Mol. Nutr. Food Res. 2011, 55, 811.
8. Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Clark JR. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography / mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric*. 2005; 85: 2149-2158.
9. Zhao J, Li H, Xi W, et al. Changes in sugars and organic acids in wolfberry (*Lycium barbarum* L.) fruit during development and maturation. *Food Chem*. 2015;173:718-



724.

10. Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chem.* 2007;103(4):1380-1384.
11. Özgen M, Serçe S, Kaya C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2009;119(3):275-279.
13. Elmac Y, Altu T. Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data. *J Sci Food Agric.* 2002;82(6):632-635.
13. Gerasopoulos D, Stavroulakis G. Quality characteristics of four mulberry (*Morus* sp) cultivars in the area of Chania, Greece. *J Sci Food Agric.* 1997;73(2):261-264.
14. Mahmood T, Anwar F, Abbas M, Saari N. Effect of maturity on phenolics (Phenolic acids and flavonoids) profile of strawberry cultivars and mulberry species from Pakistan. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4591-4607.
15. Katayama H, Takano R, Sugimura Y. Localization of mucilaginous polysaccharides in mulberry leaves. *Protoplasma.* 2008;233(1-2):157-163.
16. He X, Fang J, Ruan Y, et al. Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review. *Food Chem.* 2018;245:899-910.
17. Dan Y, Qian Z, Peng Y, et al. Revision and Improvement of Criterion on Traditional Chinese Medicines in Chinese Pharmacopoeia 2015. *Chinese Herb Med.* 2016;8(3):196-208.
18. Yang, S., Wang, B. L., & Li Y. Advances in the pharmacological study of *Morus alba* L. *Acta Pharm Sin.* 2014;49(6):824-831.
19. Céspedes CL, Valdez-Morales M, Avila JG, El-Hafidi M, Alarcón J, Paredes-López O. Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (Elaeocarpaceae). *Food Chem.* 2010;119(3):886-895.
20. Heath MC. In this issue: Secondary metabolites and plant defence. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2002;60(6):273-274.
21. Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int J Food Sci Technol.* 2012;47(10):2023-2044.
22. Fernández-Ponce MT, Parjikolaei BR, Lari HN, Casas L, Mantell C, Martínez de la Ossa EJ. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from mango leaves using different green techniques: Kinetic and scale up study. *Chem Eng J.*



- 2016;299:420-430.
23. Yuan Q, Zhao L. The Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit - A Review of Characteristic Components and Health Benefits. *J Agric Food Chem.* 2017;65(48):10383-10394.
 24. Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci.* 2007;8(9):950-988.
 25. Radojkovic M, Zekovic Z, Vidovic S, Kocar D, Maskovic P. Free radical scavenging activity, total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. *Hem Ind.* 2012;66(4):547-552.
 26. Espada-Bellido E, Ferreira-González M, Carrera C, Palma M, Barroso CG, Barbero GF. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chem.* 2017;219:23-32.
 27. Liang L, Zhu M, Li F, et al. Chemical composition, nutritional value, and antioxidant activities of eight mulberry cultivars from China. *Pharmacogn Mag.* 2012;8(31):215.
 28. Liu LK, Lee HJ, Shih YW, Chyau CC, Wang CJ. Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL. *J Food Sci.* 2008;73(6):113-121.
 29. Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Kuo WH, Chiang CL, Hsieh YS. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett.* 2006;235(2):248-259.
 30. Miyazawa T, Nakagawa K. Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-glucoside and Cyanidin-3, 5-diglucoside, into Rats and Humans. *J Agric Food Chem.* 1999;47(3):1083-1091.
 31. Chen Y, Zhang W, Zhao T, et al. Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry. *Food Chem.* 2015;194:712-722.
 32. Liu X, Xiao G, Chen W, Xu Y, Wu J. Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins. *J Biomed Biotechnol.* 2004;2004(5):326-331.
 33. Dugo P, Mondello L, Errante G, et al. Identification of Anthocyanins in Berries by Narrow-Bore High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Detection. *J Agric Food Chem.* 2001;49:3987-3992.
 34. Ashoor SH, Knox MJ. Determination of organic acids in foods by high-performance liquid chromatography: Citric acid. *J Chromatogr A.* 1984;299:288-292.
 35. Famiani F, Baldicchi A, Battistelli A, Moscatello S, Walker RP. Soluble sugar and organic acid contents and the occurrence and potential role of phosphoenolpyruvate



- carboxykinase (PEPCK) in gooseberry (*Ribes grossularia* L.). *J Hortic Sci Biotechnol.* 2009;84(3):249-254.
36. Basson CE, Groenewald JH, Kossmann J, Cronjé C, Bauer R. Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. *Food Chem.* 2010;121(4):1156-1162.
37. Viljakainen S, Visti A, Laakso S. Concentrations of organic acids and soluble sugars in juices from nordic berries. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci.* 2002;52(2):101-109.
38. Veberic R, Jakopic J, Stampar F, Schmitzer V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chem.* 2009;114(2):511-515.
39. Naude, A. & Nicol, W. Malic acid production through the whole-cell hydration of fumaric acid with immobilised *Rhizopus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* 2018;137:152-161.
40. Belwal, T. *et al.* A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018;100:82-102.
41. Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M, Velić D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J Food Eng.* 2007;81(1):236-242.
42. Heinonen J, Farahmandazad H, Vuorinen A, Kallio H, Yang B, Sainio T. Extraction and purification of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Bioprod Process.* 2016;99:136-146.
43. Su X, Xu J, Rhodes D, et al. Identification and quantification of anthocyanins in transgenic purple tomato. *Food Chem.* 2016;202:184-188.
44. Mason TJ, Paniwnyk L, Lorimer JP. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrason Sonochem.* 1996;3(3):25-260.
45. Santos P, Aguiar AC, Barbero GF, Rezende CA, Martínez J. Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. *Ultrason Sonochem.* 2015;22:78-88.
46. Pradal D, Vauchel P, Decossin S, Dhulster P, Dimitrov K. Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrason Sonochem.* 2016;32:137-146.



47. Pasquel Reátegui JL, Machado APDF, Barbero GF, Rezende CA, Martínez J. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *J Supercrit Fluids*. 2014;94:223-233.
48. González-Centeno MR, Comas-Serra F, Femenia A, Rosselló C, Simal S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrason Sonochem*. 2015;22:506-514.
49. Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Dangles O, Chemat F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem*. 2010;119(2):851-858.
50. He B, Zhang LL, Yue XY, et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chem*. 2016;204:70-76.
51. Yadav N, Singh P, Mehrotra R. Determination of Some Ethnomedicinally Important Constituents of *Aegle marmelos* Fruit During Different Stages of Ripening. *Chin J Nat Med*. 2011;9(3):204-209.
52. Seraglio SKT, Schulz M, Nehring P, et al. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. *Food Chem*. 2018;239:649-656.
53. Gruz J, Ahmet F, Torun H, Strnad M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chem*. 2011;124(1):271-277.
54. Zhou Y, He W, Zheng W, et al. Fruit sugar and organic acid were significantly related to fruit Mg of six citrus cultivars. *Food Chem*. 2018;259:278-285.
55. Asencio AD, Serrano M, García-Martínez S, Pretel MT. Organic acids, sugars, antioxidant activity, sensorial and other fruit characteristics of nine traditional Spanish Citrus fruits. *Eur Food Res Technol*. 2018;0(0):1-12.
56. Ackermann J, Fischer M, Amadò R. Changes in Sugars, Acids, and Amino Acids during Ripening and Storage of Apples (cv. Glockenapfel). *J Agric Food Chem*. 1992;40(7):1131-1134.
57. Lee Y, Hwang KT. Changes in physicochemical properties of mulberry fruits (*Morus alba* L.) during ripening. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2017;217:189-196.
58. Lou H, Hu Y, Zhang L, Sun P, Lu H. Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba* L.) fruits development by chlorophyll



- fluorescence and RGB intensity values. *LWT - Food Sci Technol*. 2012;47(1):19-24.
59. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1998;299(1974):152-178.
60. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med*. 1999, 26, 1231–1237.
61. Ky I, Lorrain B, Kolbas N, Crozier A, Teissedre PL. Wine by-Products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules*. 2014;19(1):482-506.
62. Qin C, Li Y, Niu W, Ding Y, Zhang R, Shang X. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. *Czech J Food Sci*. 2010;28(2):117-126.
63. Zhang Y, Li P, Cheng L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in “Honeycrisp” apple flesh. *Food Chem*. 2010;123(4):1013-1018.
64. Glew RH, Ayaz FA, Sanz C, et al. Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development and maturation. *Food Chem*. 2003;83(3):363-369.
65. Wu BH, Liu HF, Guan L, Fan PGE, Li SH. Carbohydrate metabolism in grape cultivars that differ in sucrose accumulation. *Vitis J Grapevine Res*. 2011;50(2):51-57.
66. Sweetman C, Sadras VO, Hancock RD, Soole KL, Ford CM. Metabolic effects of elevated temperature on organic acid degradation in ripening *Vitis vinifera* fruit. 2014;65(20):5975-5988.
67. Mikulic-petkovsek M, Koron D, Zorenc Z, Veberic R. Do optimally ripe blackberries contain the highest levels of metabolites. *Food Chem*. 2017;215:41-49.
68. Lee Y, Lee J, Kim S, et al. Chemical Composition , Functional Constituents , and Antioxidant Activities of Berry Fruits Produced in Korea. 2015;44(9):1295-1303.
69. Veberic R, Stampar F, Schmitzer V, et al. Changes in the Contents of Anthocyanins and Other Compounds in Blackberry Fruits Due to Freezing and Long-Term Frozen Storage. *J. Agric. Food Chem*. 2014;62(29):6926-6935.
70. Glover BJ, Martin C. Anthocyanins. *Curr Biol*. 2012;22(5):147-150.
71. Kafkas E, Koşar M, Türemiş N, Başer KHC. Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chem*. 2006;97(4):732-736.



7. ANEXOS

ANEXO I

Estudios univariantes llevados a cabo para determinar las condiciones óptimas de extracción de los azúcares totales y los ácidos orgánicos totales.

- **Influencia del porcentaje de metanol en agua**

Este estudio consistió en evaluar como variaba la concentración total de ácidos y azúcares en función de la variación del porcentaje de metanol en el disolvente, manteniendo fijas el resto de variables, es decir, temperatura de extracción, valor de pH y tiempo de extracción.

Para la extracción de ácidos, en un “Falcon” se pesó 0,5 g de muestra, se añadió aproximadamente 15 mL de disolvente con el porcentaje de metanol correspondiente a cada experimento y se mantuvieron fijos el resto de variables, ciclo 0,7; amplitud 70%, temperatura de extracción 60 °C, pH 7 y tiempo de extracción 10 minutos.

Como se puede observar en la Figura AI.1, el porcentaje de metanol con el que se obtuvo una mayor concentración de ácidos fue a 0%. Por tanto, para el resto de estudios univariantes se empleó este porcentaje de metanol como disolvente.

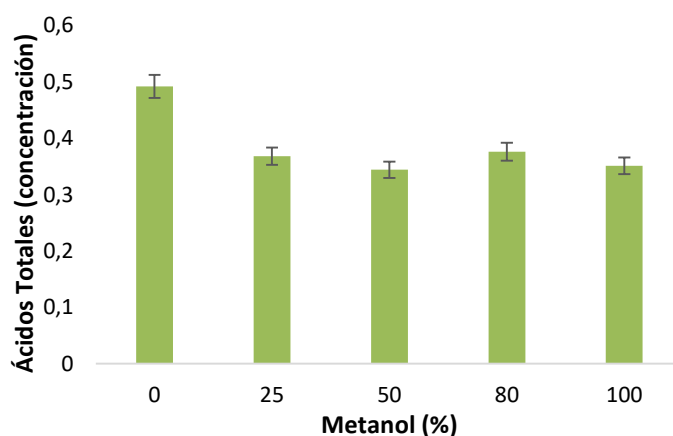


Figura AI. 1. Variación de la concentración total de ácidos con el porcentaje de metanol

En este caso, no se realizó el estudio para azúcares debido a que nos interesaba que saliese en el cromatograma los polialcoholes presentes en las muestras, cuyos picos hubiesen sido camuflados por la presencia de metanol en las mismas.

- **Influencia de la temperatura de extracción**

Este estudio consistió en evaluar como variaba la concentración total de ácidos y azúcares en función de la variación de la temperatura de extracción, manteniendo fijas el resto de variables, es decir, % de metanol, valor de pH y tiempo de extracción.

Para la extracción de ácidos y azúcares, en un “Falcon” se pesó 0,5 g de muestra, se añadió aproximadamente 15 mL de disolvente (agua), se mantuvieron fijas el resto de variables, ciclo 0,7; amplitud 70%, pH 7 y tiempo de extracción 10 minutos, mientras se modificó la temperatura a la que se realizaba la extracción, desde 10 a 80 °C.

Como se puede observar en la Figura AI.2 y AI.3, la temperatura de extracción con la que se obtuvo una mayor concentración total de ácidos y azúcares fue a 55 °C. Por tanto, para el resto de estudios univariantes se empleó esta temperatura de extracción.

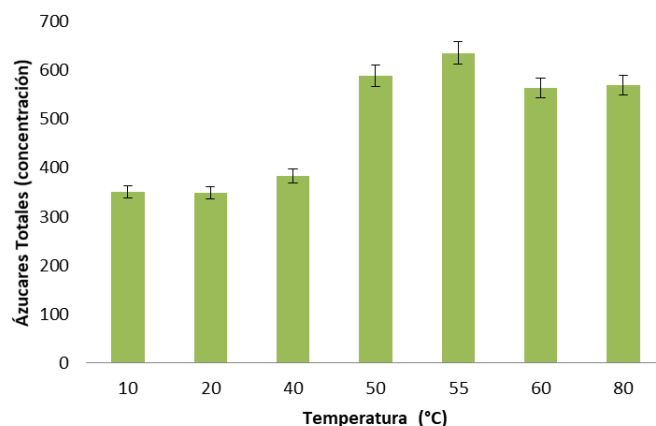


Figura AI. 2. Variación de la concentración total de azúcares con la temperatura de extracción

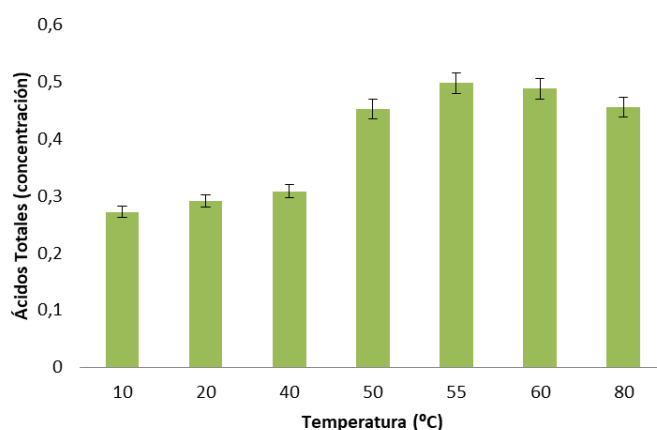


Figura AI. 3. Variación de la concentración total de ácidos con la temperatura de extracción

• Influencia del tiempo de extracción

A continuación, se estudió como variaba la concentración total de ácidos y azúcares en función de la variación del tiempo de extracción, manteniendo fijas el resto de variables, es decir, % de metanol, valor de pH y temperatura de extracción.

Para ello, en un “Falcon” se pesó 0,5 g de muestra, se añadió aproximadamente 15 mL de disolvente (agua), se mantuvieron fijas el resto de variables, ciclo 0,7; amplitud

70%, pH 7 y temperatura de extracción 55 °C, mientras se modificó el tiempo de extracción, desde 10 a 80 °C.

En las Figuras AI.4 y AI.5, se puede observar que el tiempo de extracción con el que se obtuvo una mayor concentración total de ácidos y azúcares fue a 6 minutos. Por tanto, para el resto de estudios univariantes se empleó este tiempo de extracción.

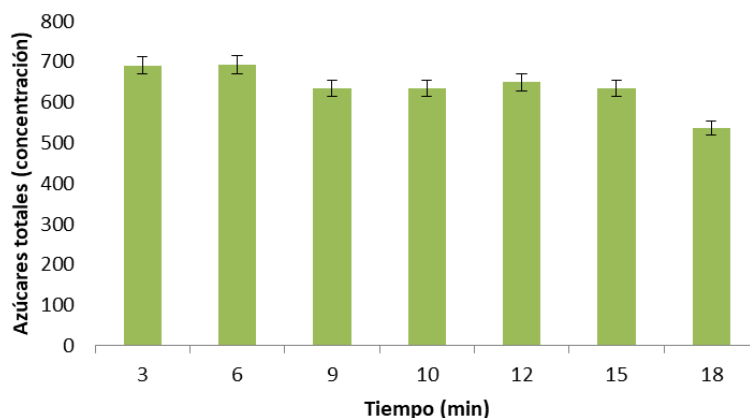


Figura AI. 4. Variación de la concentración total de azúcares con el tiempo de extracción

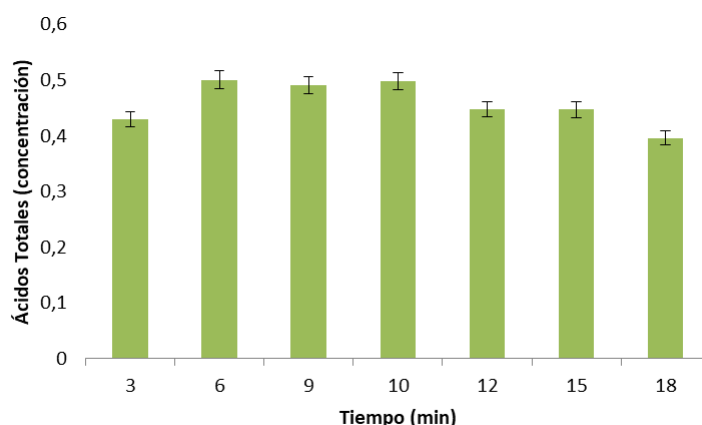


Figura AI. 5. Variación de la concentración total de ácidos con el tiempo de extracción

- **Influencia del valor del pH**

Por último, se comprobó la influencia del valor del pH en la variación de la concentración total de azúcares y ácidos, manteniendo fijas el resto de variables, es decir, % de metanol, tiempo de extracción y temperatura de extracción.

En este caso, se pesó 0,5 g de muestra en un “Falcon”, se añadió aproximadamente 15 mL de disolvente (agua) y se mantuvieron fijas el resto de variables, ciclo 0,7; amplitud 70%, tiempo de extracción 6 minutos y temperatura de extracción 55 °C, mientras se modificó el valor del pH, 3, 5 y 7.

En las Figuras AI.6 y AI.7, se puede observar que el valor de pH con el que se obtuvo una mayor concentración total de azúcares y ácidos fue 7. Quedando establecidas las condiciones óptimas de extracción para azúcares y ácidos.

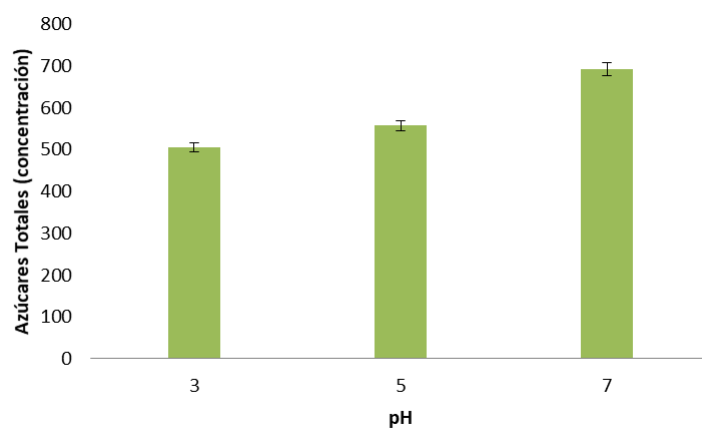


Figura AI. 6. *Variación de la concentración total de azúcares con el valor del pH*

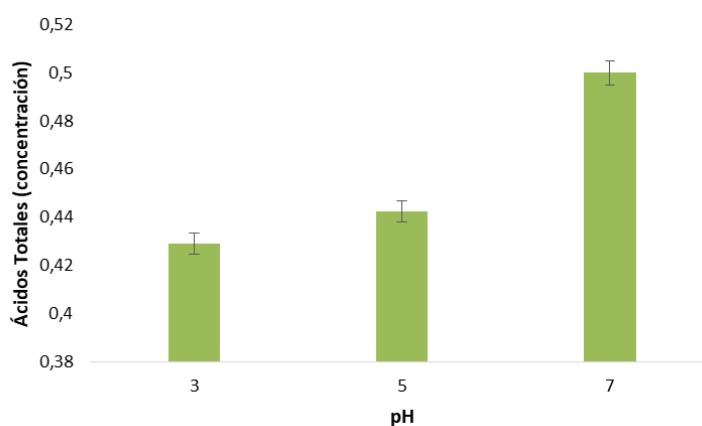


Figura AI. 7. *Variación de la concentración total de ácidos con el valor del pH*

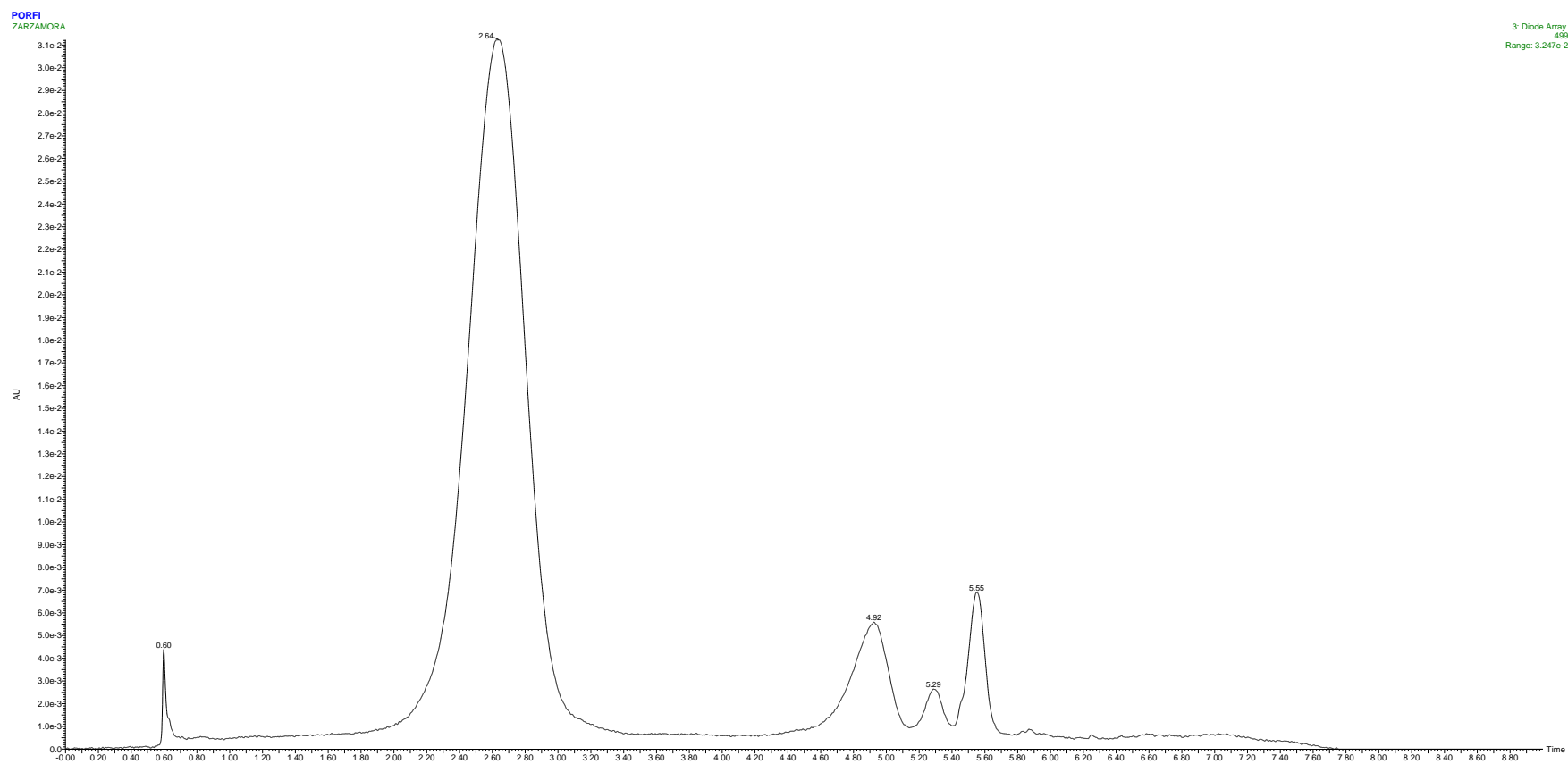


Figura AII. 1. *Espectro UV-Vis Rubus ulmifolius ($\lambda = 520 \text{ nm}$)*

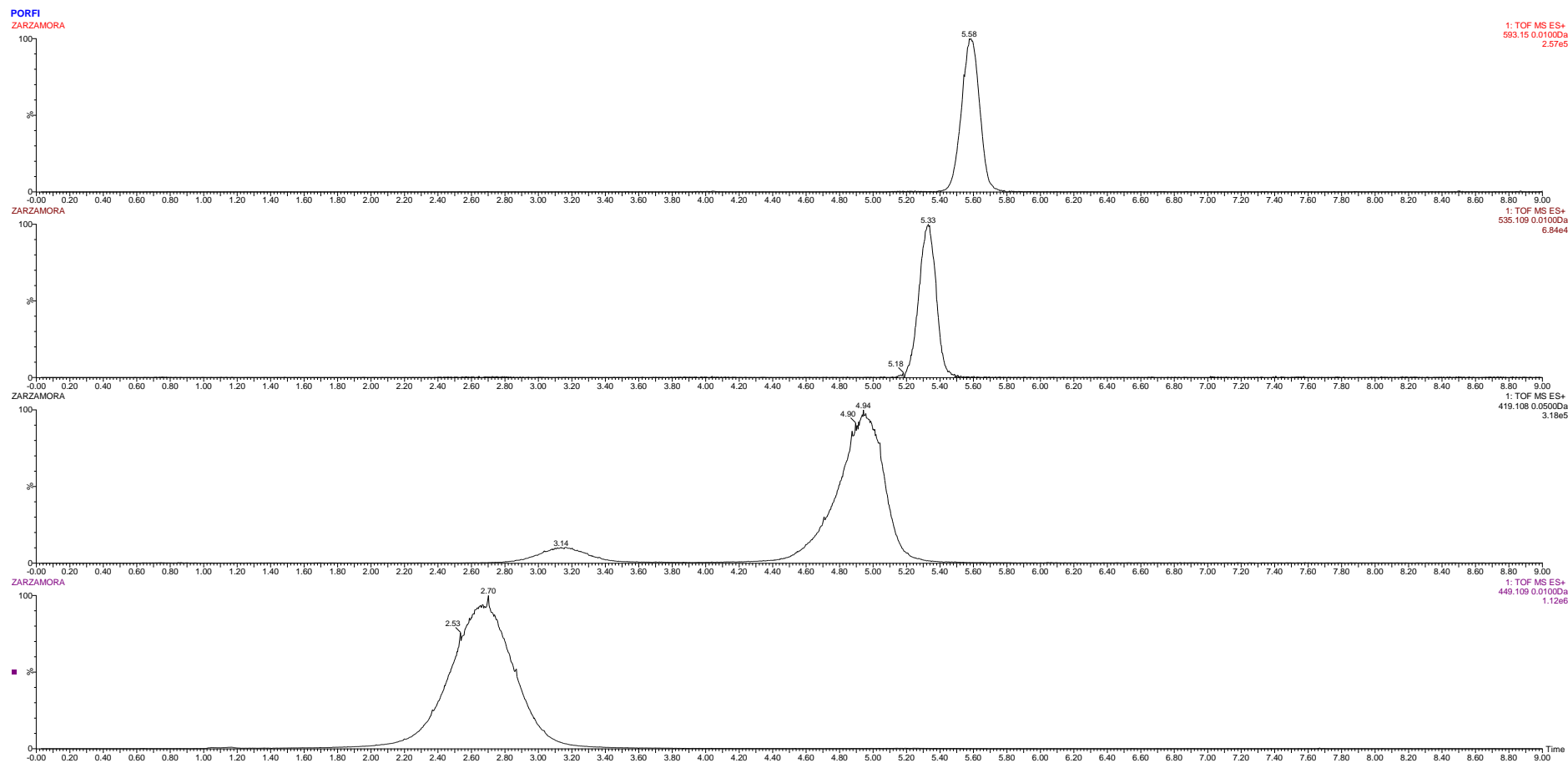


Figura AII. 2. Antocianinas identificadas en *Rubus ulmifolius*, en orden de aparición: 1) cianidina-3-*O*-glucósido 2) cianidina-3-*O*-xilósido 3) cianidina-3-*O*-(6''-mlonil-glucósido) 4) cianidina-3-*O*-(6''dioxalil-glucósido)

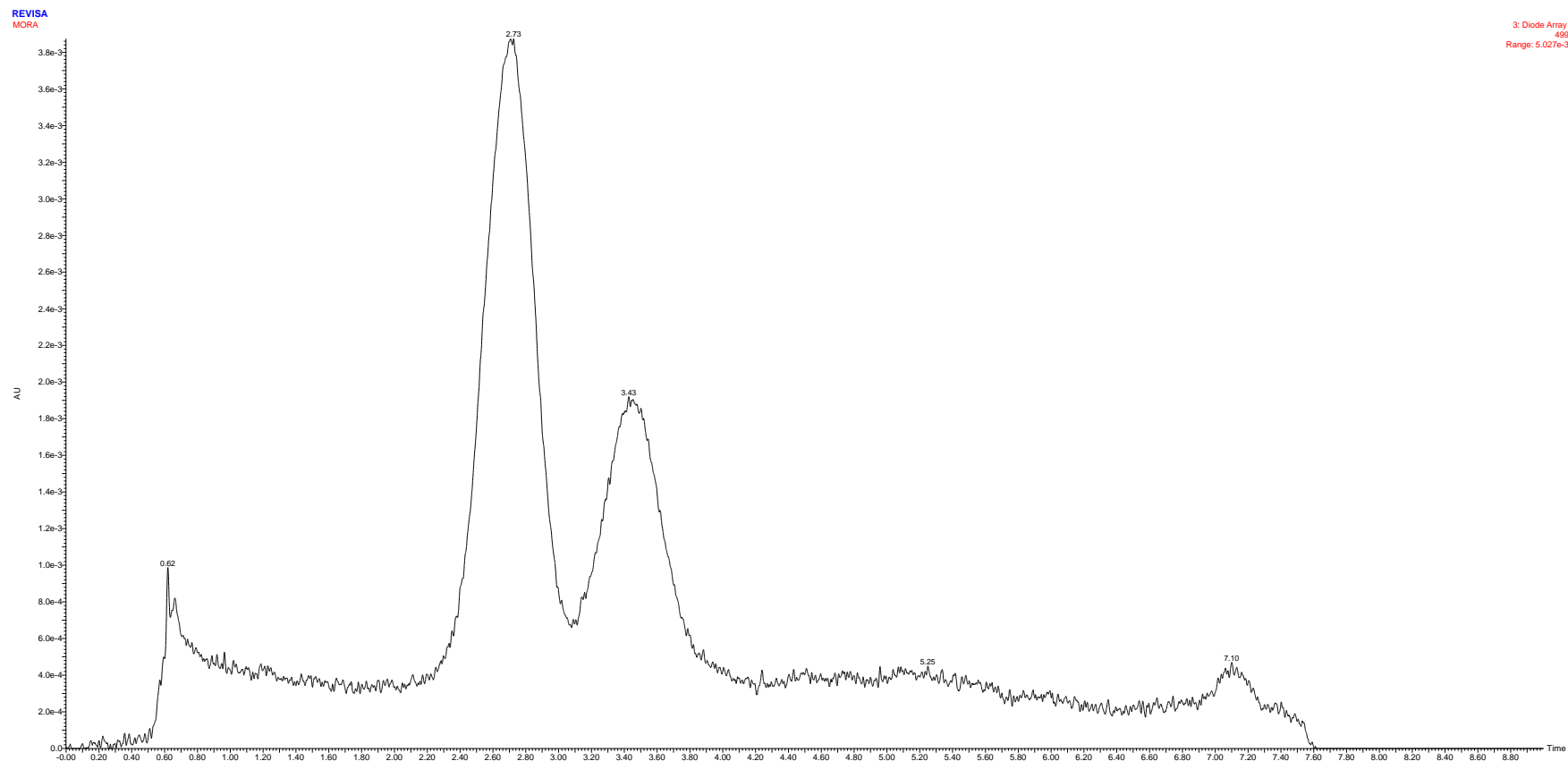


Figura AII. 3. *Espectro UV-Vis Morus Nigra ($\lambda = 520 \text{ nm}$)*

METODO POLIFENOLAS
MULBERRY-A

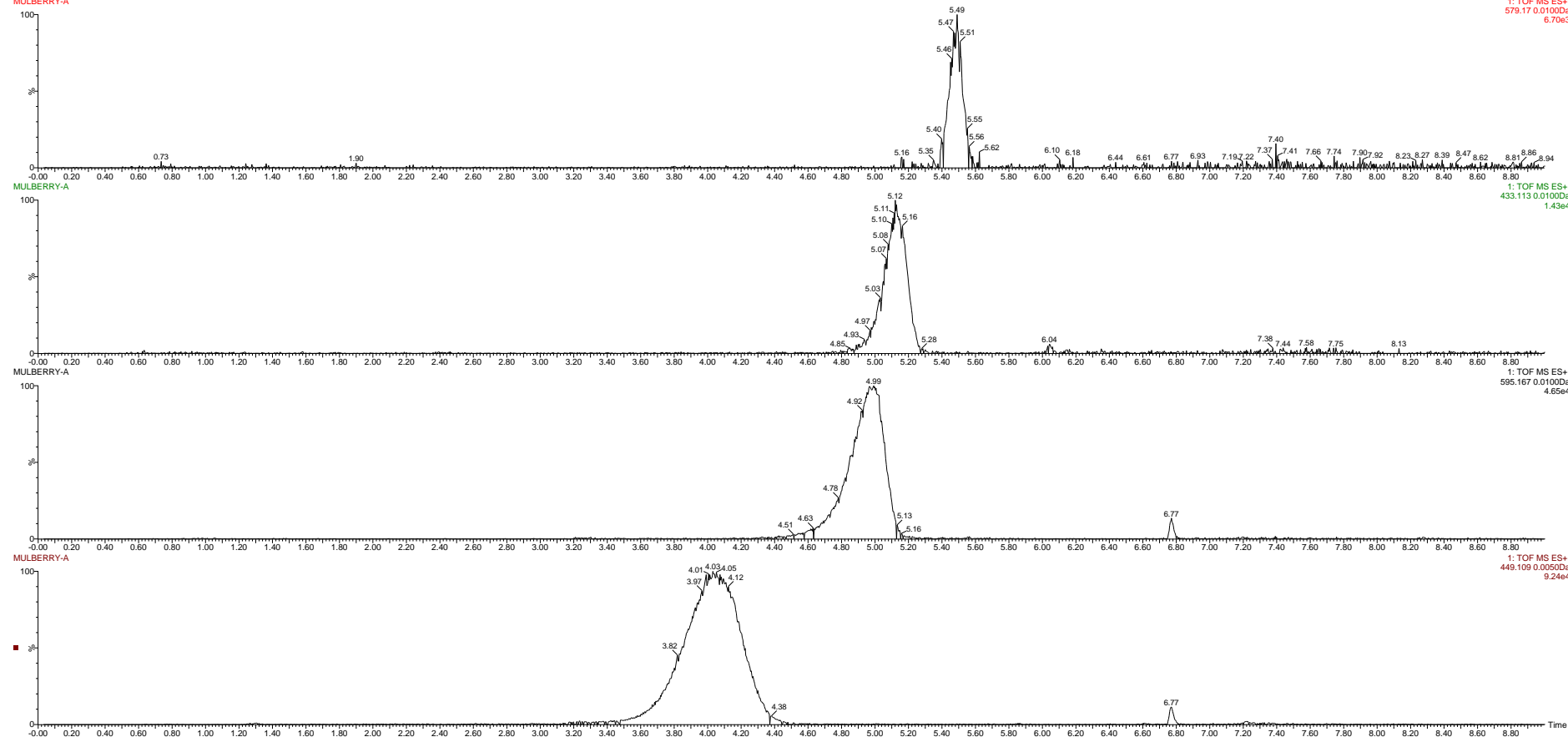


Figura AII. 4. Antocianinas identificadas en *Morus nigra*, en orden de aparición: 1) cianidina-3-O-glucósido 2) cianidia-3-orutinósido 3) pelargonidina-3-O-glucósido 4) pelargonidina-3-O-rutinósido

ANEXO III

A continuación se muestran las rectas de calibrado de cada uno de los elementos (azúcares y ácidos orgánicos) estudiados en la tabla AIII.1.

Tabla AIII. 1. *Rectas de calibrado para azúcares y ácidos orgánicos presentes en las muestras de zarzamoras y moras*

Compuesto	Recta de calibrado	R ²
Azúcares		
Inositol	$y = 4,39x - 2,21$	0,9999
Glicerol	$y = 4,56x + 7,64$	0,9999
Sorbitol	$y = 4,46x - 10,09$	0,9996
Manitol	$y = 4,77x - 1,07$	0,9997
Glucosa	$y = 1,13 + 33,77$	0,9992
Galactosa	$y = 3,61x - 3,96$	0,9941
Fructosa	$y = 2,22x + 36,88$	0,9991
Ribosa	$y = 6,28x - 15,53$	0,9993
Lactosa	$y = 2,32x - 14,26$	0,9962
Sacarosa	$y = 1,53x - 0,88$	0,9971
Ácidos Orgánicos		
Cítrico	$y = 1,99 \cdot 10^{-3}x + 0,09$	0,9997
Málico	$y = 2,06 \cdot 10^{-3}x + 0,07$	0,9992
Láctico	$y = 1,08 \cdot 10^{-3}x + 0,02$	0,9996
Acético	$y = 2,31 \cdot 10^{-4}x + 2,39 \cdot 10^{-3}$	0,9999

Tabla AIV. 1. *Evolución de los azúcares individuales en Rubus Ulmifolius*

Madurez	Azúcares (mg/g)									
	Inositol	Glicerol	Sorbitol	Manitol	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Ribosa	Lactosa	Sacarosa
1	4,69 ± 0,05	0,61 ± 0,03	0,33 ± 0,04	0,08 ± 0,05	24,54 ± 0,12	0,99 ± 0,04	12,16 ± 0,03	0,66 ± 0,01	1,14 ± 0,03	
2	3,11 ± 0,09	0,43 ± 0,01	0,29 ± 0,05	0,08 ± 0,04	19,45 ± 0,72	1,07 ± 0,06	11,37 ± 0,43	0,42 ± 0,02	0,9 ± 0,02	
3	1,56 ± 0,01	0,26 ± 0,23	0,23 ± 0,01	0,04 ± 0,01	20,66 ± 0,17	0,99 ± 0,03	12,67 ± 0,11		0,85 ± 0,09	0,33 ± 0,01
4	1,24 ± 0,02	0,09 ± 0,01		0,03 ± 0,01	28,54 ± 0,62	0,95 ± 0,01	16,79 ± 0,38		0,81 ± 0,02	0,48 ± 0,05
5	1,02 ± 0,04	0,16 ± 0,01			62,97 ± 0,37	1,09 ± 0,01	33,56 ± 0,09		0,89 ± 0,11	0,59 ± 0,03
6	0,85 ± 0,01	0,19 ± 0,01		0,04 ± 0,01	111,01 ± 0,71	1,07 ± 0,08	56,57 ± 0,88		0,75 ± 0,02	0,36 ± 0,02
7	0,98 ± 0,06	0,96 ± 0,09	0,26 ± 0,01	0,04 ± 0,01	252,75 ± 5,92	1,44 ± 0,07	128,93 ± 2,99		0,8 ± 0,05	0,32 ± 0,09
8	1,04 ± 0,02	1,25 ± 0,07	0,26 ± 0,01	0,05 ± 0,01	287,14 ± 8,14	1,34 ± 0,22	154,46 ± 5,16		0,82 ± 0,01	0,29 ± 0,02

Tabla AIV. 2. *Evolución de los ácidos orgánicos individuales en Rubus Ulmifolius*

Madurez	Ácidos Orgánicos (mg/g)			
	Cítrico	Málico	Láctico	Acético
1	3,85 ± 0,01		1,05 ± 0,006	1,52 ± 0,03
2	6,10 ± 0,12	0,62 ± 0,01		
3	1,30 ± 0,13	8,22 ± 0,09		
4	5,71 ± 0,19	11,88 ± 0,38		
5	7,85 ± 0,07	17,24 ± 0,04		
6	4,84 ± 0,09	9,67 ± 0,13		
7	2,15 ± 0,11			
8	0,58 ± 0,10			

ANEXO V

Tabla AV. 1. *Evolución de la capacidad antioxidante en Rubus ulmifolius*

ABTS			
Madurez	mg Trolox/ g Zarzamora	Media	SD
1	214,68	214,67	0,02
	214,65		
2	211,71	211,53	0,25
	211,36		
3	158,20	158,09	0,14
	157,99		
4	145,41	145,37	0,06
	145,33		
5	143,10	143,05	0,07
	142,99		
6	115,22	115,22	0,01
	115,23		
7	114,22	114,09	0,19
	113,95		
8	86,46	86,70	0,35
	86,95		

Tabla AVI. 1. *Evolución de los azúcares individuales en Morus nigra*

Madurez	Azúcares (mg/g)								
	Inositol	Glicerol	Sorbitol	Manitol	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Ribosa	Lactosa
1	1,36 ± 0,06	0,74 ± 0,01	1,56 ± 0,03	0,65 ± 0,01	14,75 ± 0,05	0,63 ± 0,03	8,44 ± 0,05	1,26 ± 0,01	2,48 ± 0,03
2	1,77 ± 0,05	0,87 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,17 ± 0,01	23,78 ± 0,16	0,90 ± 0,01	15,30 ± 0,04	1,27 ± 0,02	1,88 ± 0,02
3	2,39 ± 0,10	1,29 ± 0,02	2,49 ± 0,11	0,90 ± 0,01	35,63 ± 0,88	2,42 ± 0,29	20,92 ± 0,69	1,64 ± 0,06	1,86 ± 0,09
4	1,21 ± 0,01	0,33 ± 0,01	1,71 ± 0,01	0,24 ± 0,01	54,24 ± 0,48	1,03 ± 0,02	30,10 ± 0,43	1,11 ± 0,01	1,72 ± 0,01
5	4,99 ± 0,06	2,51 ± 0,01	1,01 ± 0,02	0,23 ± 0,01	55,59 ± 1,04	2,39 ± 0,20	35,11 ± 0,36	1,65 ± 0,04	1,65 ± 0,01
6	4,38 ± 0,19	2,70 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,24 ± 0,01	72,16 ± 0,72	2,05 ± 0,05	43,37 ± 0,64	1,36 ± 0,07	1,81 ± 0,06
7	2,25 ± 0,01	0,99 ± 0,03	1,02 ± 0,03	0,23 ± 0,02	221,97 ± 0,77	1,28 ± 0,01	112,14 ± 0,45	1,20 ± 0,01	1,85 ± 0,11
8	1,43 ± 0,02	1,66 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,24 ± 0,01	300,63 ± 0,63	1,65 ± 0,01	151,50 ± 0,66	1,01 ± 0,01	1,71 ± 0,01

Tabla AVI. 2. *Evolución de los ácidos orgánicos individuales en Morus nigra*

Madurez	Ácidos Orgánicos (mg/g)	
	Cítrico	Málico
1	1,87 ± 0,13	6,13 ± 0,06
2	8,82 ± 0,57	7,98 ± 0,37
3	63,11 ± 4,18	4,98 ± 0,11
4	129,55 ± 2,22	4,89 ± 0,38
5	155,30 ± 2,03	1,92 ± 0,09
6	192,33 ± 3,19	6,01 ± 0,23
7	136,16 ± 1,05	5,24 ± 0,10
8	74,80 ± 1,06	2,01 ± 0,06

ANEXO VII

Tabla AVII. 1. *Evolución de la capacidad antioxidante en Morus nigra*

ABTS			
Madurez	mg Trolox/ g Zarzamora	Media	SD
1	7,64	7,60	0,05
	7,57		
2	8,46	8,41	0,07
	8,36		
3	11,29	11,44	0,22
	11,59		
4	12,69	12,61	0,11
	12,53		
5	13,66	13,73	0,10
	13,79		
6	15,01	15,14	0,18
	15,26		
7	27,46	27,52	0,09
	27,59		
8	28,56	28,68	0,16
	28,79		

Tabla AVIII. 1. *Evolución de los azúcares individuales en Morus alba*

Madurez	Azúcares (mg/g)									
	Inositol	Glicerol	Sorbitol	Manitol	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Ribosa	Lactosa	Maltosa
1	4,29 ± 0,11	2,61 ± 0,03	0,72 ± 0,01		38,88 ± 0,64	1,72 ± 0,03	37,55 ± 0,46	1,42 ± 0,01	2,31 ± 0,19	
2	3,78 ± 0,04	2,93 ± 0,01	1,65 ± 0,03		76,79 ± 1,19	1,27 ± 0,04	44,39 ± 0,69	1,55 ± 0,06	2,19 ± 0,24	1,79 ± 0,01
3	3,70 ± 0,07	2,65 ± 0,01	1,47 ± 0,04		78,05 ± 0,51	1,33 ± 0,04	44,62 ± 0,35	1,47 ± 0,03	2,10 ± 0,09	1,66 ± 0,01
4	5,25 ± 0,10	2,84 ± 0,03	0,88 ± 0,02		91,49 ± 0,72	1,83 ± 0,01	73,33 ± 0,91	1,30 ± 0,01	2,55 ± 0,07	1,32 ± 0,01
5	3,99 ± 0,02	5,63 ± 0,18	0,99 ± 0,01		160,41 ± 1,42	1,82 ± 0,01	108,19 ± 0,71	1,42 ± 0,02	1,85 ± 0,02	1,43 ± 0,01
6	3,77 ± 0,05	4,52 ± 0,09	0,96 ± 0,01		316,56 ± 2,96	2,15 ± 0,10	184,25 ± 1,52	1,48 ± 0,01	1,75 ± 0,08	1,47 ± 0,07
7	3,17 ± 0,09	5,76 ± 0,01	0,86 ± 0,05		401,07 ± 1,05	2,39 ± 0,01	216,88 ± 0,32	1,68 ± 0,01	1,97 ± 0,05	1,57 ± 0,07
8	2,62 ± 0,13	5,48 ± 0,01	0,85 ± 0,01		411,81 ± 0,81	2,26 ± 0,02	218,09 ± 0,29	2,03 ± 0,04	3,91 ± 0,09	2,12 ± 0,01

Tabla AVIII. 2. *Evolución de los ácidos orgánicos individuales en Morus alba*

Madurez	Ácidos Orgánicos (mg/g)	
	Cítrico	Málico
1		4,53 ± 0,01
2		5,74 ± 0,01
3		9,22 ± 0,09
4	1,61 ± 0,01	8,92 ± 0,04
5	1,92 ± 0,01	11,33 ± 0,02
6		14,85 ± 0,15
7	0,60 ± 0,01	12,17 ± 0,02
8	6,62 ± 0,07	6,14 ± 0,07

ANEXO IX

Tabla AIX. 1. *Evolución de la capacidad antioxidante en Morus alba*

ABTS			
Madurez	mg Trolox/ g Zarzamora	Media	SD
1	16,77804508	16,6728482	0,14877088
	16,56765129		
2	18,82779288	18,5921814	0,33320498
	18,35656987		
3	20,58522608	20,5924405	0,0102027
	20,59965487		
4	21,66134555	21,5969577	0,09105815
	21,53256987		
5	22,59967896	22,6997772	0,14156031
	22,79987548		
6	25,12590263	25,1942788	0,09669851
	25,26265497		
7	31,82162177	31,7055853	0,1641004
	31,58954875		
8	32,48563356	32,6405562	0,21909366
	32,79547879		